

ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG
VON
CHLOROPHYLLABBAUPRODUKTEN

Bruno Schmidt

Duss
München
1985

Isolierung
und Strukturaufklärung
von
Chlorophyllabbauprodukten

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Bruno Schmidt
aus
München

München, Februar 1985

1. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.85

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr.W.Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof.Dr.W.Rüdiger danke ich herzlich für die Themastellung sowie für die Unterstützung der Arbeit durch stetes Interesse, hilfreiche Ratschläge und Diskussionen.

Frau Dr.S.Schoch danke ich sehr für den regen Informationsaustausch sowie für viele wissenschaftliche und persönliche Gespräche.

Frau U.Lempert danke ich für ihre Assistenz bei den Versuchen zur in vivo Inkubation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.E.Cmiel für sein Interesse und die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der NMR-Messungen. Ebenso danke ich Herrn Prof. Schäfer für die Anfertigung der Massenspektren. Herrn Prof. Scheer möchte ich für viele fachliche Ratschläge herzlich danken.

Frau Eva Glocker vom Toxikologischen Institut danke ich für die AAS Messungen.

Ein Teil dieser Arbeit wurde von der DFG finanziell unterstützt.

ABKÜRZUNGEN

Chl	Chlorophyll
Phe	Pheophytin
Pheid	Pheophorbid
MPheid	Methylpheophorbid
Chlase	Chlorophyllase
Chlid	Chlorophyllid
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PE	Petrolether
MS	Massenspektrometrie
FAB	Fast Atom Bombardment
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
EE	Ethylacetat
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tricine	N-tris-hydroxymethyl-methylglycin
TEMED	N,N,N',N' tetramethyl-ethylen-diamin
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid
DTT	Dithiothreitol
BSA	Bovine Serum Albumin
PSC	Präparative Schicht Chromatographie
2d41°C	Dunkelinkubation bei 41°C für 2 Tage = Abbaubedingungen A
3d41°C	Dunkelinkubation bei 41°C für 3 Tage = Abbaubedingungen B

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	Einleitung	1
1.	Chlorophyll: Chemische Natur und Bedeutung	1
2.	Hypothesen zum Abbau von Chl in vivo	2
3.	Ziel dieser Arbeit	5
II.	Material und Methoden	7
1.	Geräte	7
2.	Chemikalien	9
3.	Darstellung von Vergleichssubstanzen	11
3.1.	Sicherheitsvorkehrungen	11
3.2.	Chlorophyll a	12
3.3.	Allomerisierung von Chlorophyll a	13
3.4.	Pheophytin a	14
3.5.	Methylierung	14
3.5.1.	durch methanolische Schwefelsäure	14
3.5.2.	durch Diazomethan	15
3.6.	13^2 -Acetoxy-Methylpheophorbid a	16
3.7.	13^2 -Hydroxy-Methylpheophorbid a	16
3.7.1.	nach H. Fischer	16
3.7.2.	durch Allomerisierung	17
3.7.3.	durch Metallierung	17
3.8.	Hydrolyse der Methylester	18
3.9.	Darstellung von Zn- 13^2 -hydroxymethylpheophorbid a und der entsprechenden freien Säuren	19
4.	Chromatographische Systeme	20
4.1.	HPLC	20
4.2.	DC	20
5.	Zellkultur	22
5.1.	Medium und Anzucht	22
5.2.	Induktion der Seneszenz	22
5.2.1.	Dunkelstellen bei 27°C	22
5.2.2.	Dunkelstellen bei 41°C	23
6.	Untersuchung der Pigmente aus Zellkulturen	23

	Seite
6.1. Extraktion	23
6.2. Die Isolierung von MPheidX	24
6.3. Die Isolierung von "Y ₁ "	25
6.3.1. Die Zweiphasenverteilung	25
6.3.2. Reinigung über Zuckersäule	26
7. Die Isolierung von "Z"	28
7.1. Reaktionsansatz	28
7.2. Aufarbeitung	28
8. Untersuchung von enzymatischen Reaktionen in grünen und bei 27°C seneszierten Tabakzellkulturen	29
8.1. Pigmentvergleich nach Inkubation der Homogenate	29
8.2. Versuche zum Nachweis der Lipxygenase	30
8.3. Versuche zum Nachweis der Mg-Dechelataase	31
9. Pigmentanalyse von dunkel gestellten intakten Pflanzen	32
10. Präparation von Chlorophyll-Protein	32
10.1. aus Spinat	32
10.2. aus frischen Zellkulturen	34
10.3. aus gealterten Zellkulturen	36
11. Elektrophoretische Systeme	38
III. Ergebnisse und Diskussion	41
1. Beschreibung des verwendeten Systems	41
2. Das Pigment "X"	43
2.1. Absorptionsspektrum des Rohextraktes	43
2.2. Chromatographisches Verhalten	44
2.2.1. DC	44
2.2.2. Chromatographie der Methylester	48
2.3. Herstellung, Trennung und Reinigung der Methylester	48
2.4. Darstellung von 13 ² -Hydroxy-Methylpheophorbid a	49
2.5. Massenspektren	51
2.6. Kernresonanzspektren	54
2.7. Chromatographischer Vergleich der Methylester	57

	Seite
2.8. Chromatographischer Vergleich der Pheophorbide	59
2.9. CD-Spektroskopie	61
2.10. Diskussion	62
3. Isolierung und Strukturaufklärung von "Y"	64
3.1. Vorkommen und chromatographisches Verhalten	66
3.2. Reinigung von "Y ₁ "	66
3.3. Derivatisierung von "Y ₁ "	66
3.3.1. Methylierung mit methanolischer Schwefelsäure	67
3.3.2. Methylierung mit Diazomethan	67
3.3.3. Entmetallierung	67
3.4. Synthese von Vergleichssubstanzen	67
3.4.1. Synthese des Lactonderivats	67
3.4.2. Synthese von Zn-13 ² -OH-Methylpheophorbid	68
3.5. Chromatographie der Derivate und Vergleichssubstanzen	69
3.6. Spektroskopische Untersuchung von "Y" und Derivaten	70
3.6.1. Absorptionsspektren der metallhaltigen Verbindungen	70
3.6.2. Absorptionsspektren der entmetallierten Verbindungen	71
3.6.3. Fluoreszenzspektrum	72
3.6.4. Massenspektrum	72
3.6.5. Kernresonanzspektrum	73
3.6.6. Atomabsorption	75
3.6.7. CD-Spektroskopie	75
3.7. Chromatographische Untersuchung der freien Säuren	77
3.8. Diskussion	78
4. Das Pigment "Z"	79
4.1. Vorkommen und Reinigung	79
4.2. Derivatisierung von "Z"	81
4.2.1. Entmetallierung	81
4.2.2. Methylierung	81
4.3. Spektroskopische Untersuchungen	83

	Seite
4.3.1. Absorptionsspektren	83
4.3.2. Massenspektrometrie	85
4.3.3. Kernresonanzspektrum	86
4.3.4. CD-Spektrum	87
4.3.5. Fluoreszenzspektren	88
4.4. Diskussion	89
5. Enzymatische Untersuchungen an Tabakzellkulturen	93
5.1. Pigmentvergleich nach Inkubation der Homogenate	93
5.2. Versuche zum Nachweis der Lipxygenase	98
5.3. Versuche zum Nachweis der Mg-Dechelatase	102
5.4. Diskussion	103
6. Untersuchungen an dunkel gestellten intakten Pflanzen	106
7. Versuche zur Auftrennung von Chlorophyll- Proteinen	110
7.1. Präparation von Thylakoiden	113
7.1.1. aus Spinat	113
7.1.2. aus grünen Tabakzellkulturen	113
7.1.3. aus abbauenden Tabakzellkulturen	114
7.2. Elektrophorese	117
7.3. Diskussion	118
IV. Zusammenfassung	119
V. Literaturverzeichnis	121
VI. Anhang	133

I. Einleitung

1. Chlorophyll: Chemische Natur und Bedeutung

Die Chlorophylle sind die grünen Pigmente photosynthetischer Organismen. Chemisch gesehen bestehen die Chlorophylle aus einem Chromophor, einem cyclischen, Mg-haltigen Tetrapyrrolkörper, an dem durch Esterbindung ein lipophiler Terpenoidalkohol, in der Regel Phytol angekoppelt ist.

Chlorophyll ist ausschließlich in bestimmten Zellorganellen, den Chloroplasten lokalisiert, wobei es in nicht kovalenter Bindung mit Proteinen der Thylakoidmembran assoziiert ist (Goedheer, 1966; Park, 1966; Markwell et al 1979). Chlorophyll ist der Katalysator für die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie. Es ist somit eine wichtige Voraussetzung für das Leben auf der Erde.

Dieses Molekül verschwindet im Herbst im Millionen Tonnen Maßstab, um im Frühjahr neu synthetisiert zu werden. Angesichts des Umfangs dieses Prozesses ist es erstaunlich, daß zwar der Biosyntheseweg weitgehend aufgeklärt ist, daß aber über den Abbauweg, besonders was die chemische Veränderung des Moleküls betrifft, nur sehr wenige Untersuchungen existieren. Im Gegensatz dazu ist der Abbau anderer Tetrapyrrole wie z.B. Hämoglobin, zu großen, noch farbigen Zwischenprodukten bekannt (Brown, Troxler 1983).

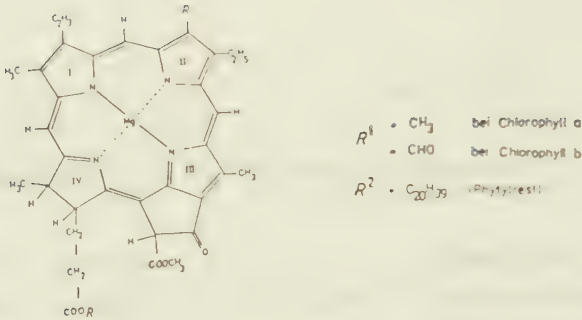


Abb. 1: Chlorophyll a und b

2. Hypothesen zum Abbau von Chl in vivo

Die frühen Arbeiten von Willstädter und Stoll (1918) zeigen, daß der Chlorophyll Gehalt in gelben Blättern niedriger ist als in grünen. Eine Übersicht über die früheren Berichte gibt Goodwin (1958).

Der Verlust des Pigments als sichtbares Zeichen der Seneszenz ist schon sehr früh beschrieben worden (Meyer 1883, Stahl 1909). Tatsächlich wird sogar die Abnahme des Pigments als Maß für das Fortschreiten der Seneszenz grüner Gewebe verwendet (Thimann 1980, Kufner 1980). Es gibt einige Untersuchungen über chemische Einflüsse auf Chlorophyll in vivo, z.B. durch Rauchgasemissionen (Tiegs 1938, 1939; Bethge 1957). Einige Abbauprodukte wurden als Folge tierischer Verdauung nachgewiesen (Seybold, Egle 1939; Fischer, Orth 1940). Ob der Abbau von Chlorophyll jedoch ein enzymatischer Prozeß ist und damit einer biologischen Steuerung unterliegt ist bis in neueste Zeit umstritten (Thomas, Stoddart 1980; Egle 1960).

Das Hauptgewicht der Untersuchungen über Seneszenz liegt heute beim Proteinabbau (Stoddart und Thomas 1982; Martin und Thimann 1972), dem Einfluß von Licht (Thimann et al 1977; Biswal et al 1982; Tucker 1981), einiger Pflanzenhormone (Gepstein und Thimann 1981; Tetley and Thimann 1974) oder einiger Herbizide (Kleudgen 1979; Tantawy und Grimme 1982).

Zwischenprodukte des Chlorophyllabbaus werden in vivo normalerweise nicht angereichert und sind deshalb sehr schwierig nachzuweisen. Als einleitende Schritte werden die Entfernung des Zentralatoms Mg und die hydrolytische Spaltung der Phytylesterbindung diskutiert (Schoch, Vielwerth 1983). Die Hydrolyse könnte durch das Enzym Chlorophyllase (E.C.3.1.1.14) katalysiert werden (Terpstra 1981; Sabater und Rodriguez 1978; Ziegler und Schanderl 1969). Andererseits deuten die Ergebnisse von Park et al (1973) auf eine besondere Stabilität der Phytylestergruppe in abbauenden Blättern hin. Der Nachweis von Pheophytin und Pynopheophytin (Greenblatt und Schiff 1959; Schoch et al 1981) als erste Abbauprodukte in dunkelgestellter Euglena legt nahe, daß der erste Abbauschritt die Entfernung des Mg ist. 1982 beschrieben Owens und Falkowski ein Enzym, welches die Entfernung von Mg aus Chl bzw Chlid in Phytoplankton katalysiert. Ziegler et al. (1982 a, b) fanden eine "Mg-Dechelataase" in einer Chlorella Mutante, welche spezifisch für unveresterte Chlorophyll-Derivate ist.

Auch die Beteiligung von mindestens drei oxidativen

Enzymsystemen am Abbau von Chlorophyll zu farblosen Substanzen wird diskutiert. Holden (1965) beschrieb eine Lipxygenase Reaktion, in deren Verlauf Chl ausgebleicht wird, wenn es in Gegenwart von Linol- oder Linolensäure inkubiert wird. Nach Sakai-Imamura (1975) ist die Chlorophyll ausbleichende Aktivität ("chl-bleaching activity") tatsächlich identisch mit Lipxygenase. Weder Holden noch Sakai-Imamura beschreiben jedoch chemische Folgeprodukte des Chlorophylls.

Matile (1980) und Huff (1982) haben eine "chl bleaching activity" im Zusammenhang mit Peroxidase (E.C.1.11.1.7) beobachtet.

Das dritte oxidative System, vorläufig als "Chl Oxidase" bezeichnet wird von mehreren Autoren beschrieben (Martinoia et al. 1982, Lüthy et al. 1984). Im Gegensatz zum Lipxygenase System, welches eine 1.4. Pentadienstruktur beim Substrat erfordert, ist die Chlorophyll Oxidase auch in Gegenwart von Del- und Stearinsäure aktiv und strikt an Thylakoide gebunden. Von diesen drei Systemen ist bisher nur von einem einzigen, dem Chl - Oxidase System, zumindest ein Reaktionsprodukt des Chlorophylls bekannt, 132-OH Chl a (Schoch et al. 1984).

Barret und Jeffrey (1962) konnten ein "atypical chl^{id}", welches sehr wahrscheinlich oxidativ verändert war, als Nebenprodukt der Chlase Reaktion in Diatomeen beobachten.

Zum Grenzbereich zwischen enzymatischer oxidativer Veränderung und chemischer Allomerisation muß die

Untersuchung von Pennington et al. (1967) gerechnet werden, in welcher über die Entstehung von 13^2 -OH Chlorophyllen in acetone- und methanolbehandelten Löwenzahn- und Malvenblättern berichtet wird.

Insgesamt ist also über die chemischen Veränderungen, denen Chlorophyll während des Abbaus unterliegt, vergleichsweise wenig bekannt. Die Untersuchungen scheiterten häufig an Materialmangel, verbunden mit den Problemen, die die früher weniger ausgereifte instrumentelle Analytik mit sich brachte. Auch ist zu beachten, daß Chlorophylle gegen Licht, Sauerstoff, Säure, erhöhte Temperatur und alkoholhaltige Lösungsmittel recht empfindlich sind, so daß die Abgrenzung zu während der Aufarbeitung entstehenden Artefakten oftmals schwierig ist.

3. Ziel dieser Arbeit

1. Ausgehend von der Beobachtung, daß in dunkelgestellten Tabakzellkulturen ein neues Pigment, kurz als Pigment "X" bezeichnet, auftaucht (Schoch, Vielwerth 1983), sollte dieses Pigment isoliert, gereinigt und die Struktur aufgeklärt werden.

2. Im weiteren Verlauf der Untersuchung, wurde ein zusätzliches Pigment entdeckt - als "Y" bezeichnet - welches ebenfalls bei Dunkelinkubation von Tabakzellkulturen entsteht. Dieses Produkt sollte ebenfalls gereinigt und identifiziert werden.

3. In einem Modellsystem zur Chlorophyll - Oxidase - Reaktion konnte bereits 13^2 - hydroxy - Chl a als

Reaktionsprodukt nachgewiesen werden (Schoch, in Vorbereitung). Das zweite Hauptprodukt der Modellreaktion - als "Z" bezeichnet - sollte ebenfalls näher charakterisiert werden.

4. Die Reaktionsprodukte der Lipoxxygenase-Reaktion (Sakai-Imamura 1975) sollten untersucht werden.

5. Es wurde beobachtet, daß durch Dunkelinkubation von Tabakzellkulturen Zwischenprodukte des Chlorophyllabbaus angereichert werden können. Es sollte überprüft werden, ob dies auch bei intakten Pflanzen der Fall ist.

6. Die oben gezeigte Vielfalt von ersten Abbauprodukten von Chl in Pflanzen läßt die Frage offen, wann Chlorophyll vom Protein gelöst wird: Vor der chemischen Veränderung (Oxidation, Entmetallierung), oder ob die Veränderung noch am Chromophor - Proteinkomplex stattfindet. Diese Frage sollte anhand von elektrophoretischen Vergleichen von Chlorophyll - Proteinen, isoliert sowohl aus grünen als auch seneszenten Tabakzellkulturen, beantwortet werden.

II. Material und Methoden

1. Geräte

Photometer:

a) UV-VIS-Spektren wurden mit dem Spectrometer 320 der Fa. Perkin Elmer in Glas bzw. Quarzküvetten mit der Schichtdicke 1 cm aufgenommen.

b) in vivo-Spektren wurden mit dem UNICAM SP 1800 Spektrometer aufgenommen (Fa. UNICAM)

c) Fluoreszenzspektren wurden mit dem Zweistrahlsspektrophotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator aufgezeichnet (Fa. Zeiss)

Densitometer:

Bei einem Teil der Versuche wurden die Spots der DC mit einem Densitometer der Fa. Vitatron ausgemessen (Filter 663 nm, Durchlicht)

HPLC:

Gerät HPLC Waters System

Model 6000 A (zwei Pumpen)

Model U 6 K (Injektor)

Model 660 A (Solvent Programmer)

Detektoren

a. Latek Heidelberg Spectro Monitor II

b. Fluoreszenzdetektor

Fa. Kratos

Modell FS 950 Fluoromat

gemessen.

Atomabsorption

Die AAS-Messungen der Zn-Derivate wurden mit dem AAS Perkin Elmer 432 gemessen. Standardbedingungen Zn 2, Zink-Hohlkathodenlampe 213.9 nm, Spalt 0.7 nm

Elektrophorese

Zum Einsatz kam das Platten-Gel Elektrophoresegerät der Fa. Hölzl

Impfbank

Sterile Arbeiten konnten an einer Laminar Flow Bank der Fa.Büttner, Schilde und Haas AG ausgeführt werden.

Autoklav: Vapoklav 400 E Fa.Sterico

Durchflußküvette: Serva Chromatocord

2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren entweder von p.A. Qualität oder wurden vor Gebrauch entsprechend gereinigt. Wenn nicht anders angegeben wurden die Reinigungsschritte durchgeführt wie im "Organikum" (1960) beschrieben.

Besonderer Wert wurde auf die Reinheit von Ether,

Dioxan und Chloroform gelegt.

a) Gewinnung von peroxidfreiem Ether und Dioxan

Es wurde die Methode von Larsen (1955) angewendet. Hierzu wurde 1 l technischer Ether bzw. Dioxan mit 0.5 g fein zerstoßtem Calciumoxid und 2 g Eisen (II)-sulfat und ca. 25 ml dest. Wasser drei minuten lang kräftig im Scheidetrichter geschüttelt, dann die grau bis grau-grüne wässrige Phase verworfen. Nach insgesamt dreimaligem Ausschütteln wurde über eine Kolonne destilliert; 50 ml Vorlauf und die letzten 100 ml wurden verworfen.

b) Reinigung von Chloroform

Da sich aus Chloroform beim Stehen sehr schnell HCl bildet (über Phosgen als Zwischenstufe), andererseits das zur Stabilisierung verwendete Ethanol bei manchen Aufarbeitungen stört (z.B. Zuckersäulen) ist es nötig, vor Versuchsbeginn frisch gereinigtes Chloroform herzustellen. Dazu wird folgendermassen vorgegangen: Ca. 1 l technisches Chloroform wird mit 20 ml konzentrierter Schwefelsäure kräftig geschüttelt, mit dest. Wasser wird säurefrei gewaschen. Anschliessend wird über Calciumchlorid getrocknet und über eine Kolonne destilliert.

c) Herstellung von Diazomethan

in einen 50 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Vorstoß und absteigendem Kühler gibt man eine Lösung von 3 g KOH in 5 ml dest. Wasser, 17 ml "Carbitol" (Diäthylenglycolmonoethylether) und 5 ml Ether. Man erhitzt diese Mischung im Wasserbad auf 70 - 75°C. Sobald der Ether zu sieden beginnt, tropft man eine Lösung von 10 g N-methyl N-nitroso-p-Toluolsulfonamid in ca. 80 ml Ether innerhalb 15 min zu. Während der Destillation muß die Mischung im Destillationskolben gerührt und die Vorlage gut gekühlt werden.

3. Darstellung von Vergleichssubstanzen

3.1. Sicherheitsvorkehrungen

Alle Chlorophyll-Derivate sind mehr oder weniger empfindlich gegen Licht, Wärme, Säuren, Sauerstoff und alkoholhaltige Lösungsmittel. In besonderem Maß gilt dies für Pigmente mit einem Zentralatom und einem β -Ketoestersystem. Deshalb wurde immer im abgedunkelten Labor oder bei grünem Sicherheitslicht gearbeitet. Die Pigmente wurden während der Bearbeitung immer wieder mit Stickstoff überschichtet, alle Lösungen wurden ins Eisbad gestellt, sobald als möglich eingeeengt und unter Stickstoff im Gefrierschrank bei -18°C aufbewahrt.

3.2. Isolierung von Chlorophyll a

a) aus Spirulina geitleri

s.geitleri ist eine Chlorophyll b freie Mutante. Ca. 5 g sprühgetrocknete Algen werden mit 100 ml 80 % igem Aceton im Waring Blendor unter Stickstoff 30 sec. gemixt. Der Zellbrei wird in eine G1 Fritte überführt und durch leichten Stickstoffüberdruck in ein Vorratsgefäß überführt. Dies wird ca. 5 Mal wiederholt, bis der Acetonextrakt nur noch schwach gefärbt ist. Dann wird durch Waschen mit dest Wasser in Ether überführt und eingeeengt.

Die weitere Reinigung erfolgt über eine Dioxanfällung (Iriyama et al 1979). Es wird in 130 ml Aceton aufgenommen und mit 18 ml Dioxan versetzt. Dann wird tropfenweise sehr langsam (30 Tropfen/min) unter Kühlung und Rühren dest. Wasser zugesetzt, bis die Lösung deutlich trüb wird (ca. 26 ml). Jetzt wird 1 Stunde im Eisbad stehen gelassen. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (10 min 10000 g) und der überstand abdekantiert.

Vorbereitung der Zuckersäule

1 kg Puderzucker (Fa. Südzucker) wird mit 30 g Kartoffelstärke gründlich vermischt und durch ein Mehlsieb gesiebt. Die Mischung wird 12 Stunden im Trockenschrank bei 60°C getrocknet. Die Säule (Füllhöhe 25 cm, 4 cm Ø) wird in kleinen Anteilen trocken gestopft.

Der Niederschlag der Dioxanfällung wird in sehr wenig Ether gelöst, dann wird Petrolether (40-60°C) zugegeben bis eine 10%-ige Lösung von Ether in PE

vorliegt. Diese Lösung wird nun auf die Zuckersäule aufgetragen. Entwickelt wird zunächst mit PE bis die β -Carotinreste nahezu am Auslauf der Säule angelangt sind. Dann wird mit PE:n-Propanol 99.5:0.5 entwickelt bis das Chlorophyll aus der Säule eluiert ist. Die Chl a Lösung wird mit 80% und 50% Methanol gewaschen, zum Schluß mit dest Wasser alkoholfrei gewaschen, getrocknet und am Rotavapor einrotiert.

b) aus Spinat

Zur Gewinnung von Chl aus Spinat wird wie unter II.6.1. beschrieben extrahiert und mit Dioxan gefällt. Die Reinigung über die Zuckersäule muß meist wiederholt werden, da bei einmaliger Durchführung noch keine vollständige Trennung von Chl b erfolgt.

3.3. Allomerisierung von Chlorophyll a

"Allomerisierung" beschreibt bei Chlorophyllen die Tatsache, daß beim Stehen in Alkohol und Kontakt mit Luftsauerstoff eine komplexe Reaktion abläuft, die zu einer ganzen Reihe von Produkten führt. Johnston und Watson (1956), Holt (1958), Pennington (1967) und Hynninen (1981) haben diese Reaktion untersucht. Seely (1966) hat die frühere Literatur zusammengefasst. Die folgende Vorschrift lehnt sich an die Methode von Pennington (1967) an.

166 mg Chl a werden unter leichtem Schütteln in 20 ml Methanol gelöst. Nachdem die Lösung drei Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln stand wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen. Der feste Rückstand wird

in Ether:Petrolether (1:10) aufgenommen und über eine Zuckersäule getrennt (gleiche Bedingungen wie bei der Reinigung von Chl a). Es können drei Fraktionen getrennt werden:

a) 13²-methoxy-lacton-Chl a (Ausbeute: ca.10%)

b) 13²-methoxy-Chl a (" ca.40%)

c) 13²-hydroxy-Chl a (" ca.40%)

Die getrennten Fraktionen werden alkoholfrei gewaschen, getrocknet und eingeengt unter Stickstoff bei -18°C aufbewahrt.

3.4. Pheophytin a

Das zu entmetallisierende Pigment (Chl a) wird in Ether gelöst, mit Wasser unterschichtet und tropfenweise bis zum Farbumschlag mit konzentrierter HCl versetzt. Nach 10 min Reaktionszeit wird mit Wasser, gesättigter NaHCO₃ lösung und nochmals Wasser neutral gewaschen, mit NaCl getrocknet und eingeengt.

3.5. Methylierung

3.5.1. Methylierung mit methanolischer Schwefelsäure

Chl a oder Phe a wird in 20 ml einer Mischung von Chlorform : Methanol 1:1 mit 2.5% Schwefelsäure gelöst (= Methylierungsgemisch). Die Farbe schlägt dabei nach blau um. Die Lösung wird mit Stickstoff gespült und dann 30 min am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit Wasser bis zur Phasentrennung versetzt, Die

Chloroformlösung 2x mit Wasser, 2x mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und wieder 2x mit Wasser gewaschen. Die Lösung wird mit NaCl getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Falls erforderlich kann über präp. DC gereinigt werden (System 1). Das Produkt wird in sehr wenig Methylenchlorid gelöst und durch kalten PE (40-60 °C) ausgefällt. Die Kristalle werden unter Stickstoff bei -18°C aufbewahrt.

3.5.2. Methylierung mit Diazomethan

Die zu methylierenden Säuren werden in wenig Ether gelöst, dann wird bis zur bestehenden Gelbfärbung Diazomethan im überschuß zugesetzt. Nach 10 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird im Stickstoffstrom zur Trockne eingeblasen.

3.6. Darstellung von 13²-acetoxy-MPheid a
 (Fischer und Heckmaier 1934a)

300 mg Methylpheophorbid a werden in 100 ml abs Alkohol mit 1 g Jod und 3 g wasserfreiem Na-acetat 20 min im siedenden Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen scheidet sich ein großer Teil des Umsetzungsproduktes in Form von kristallisierten Platten ab. Nach dem Absaugen wird mit Ether versetzt und mit Wasser alkoholfrei gewaschen. Das Reaktionsprodukt wird über PSC (System 1) gereinigt.

3.7. Darstellung von 13²-OH-MPheid a

3.7.1. nach H.Fischer et al. (1934b)

500 mg 13²-Acetoxy-MPheid a werden in 30 ml 80%-iger Schwefelsäure 12 Std. bei 80°C stehen gelassen. Dann werden 100 ml Ether zugegeben. Durch Verdünnung und Neutralisierung mit Natriumhydrogencarbonat wird in Ether überführt. Die Aufreinigung erfolgt über präparative DC (System 1). Die Ausbeute ist sehr schlecht, da der größte Teil hydrolytisch gespalten wird. Das Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak bei 622 (vgl. III.2.5). Das Absorptionsspektrum zeigt Maxima bei 409 und 667 nm (Ether) und entspricht einem Phe a Spektrum.

3.7.2. durch Allomerisierung (Pennington 1967)

Die Allomerisierungsprodukte (Hydroxy-, Methoxy- und Methoxylactonderivat) werden mit Methylierungsgemisch versetzt und 30 min am Rückfluß am Sieden gehalten. Nach Abkühlung, Neutralwaschen, Trocknen und Einengen kann über präparative DC aufgereinigt werden (System 1).

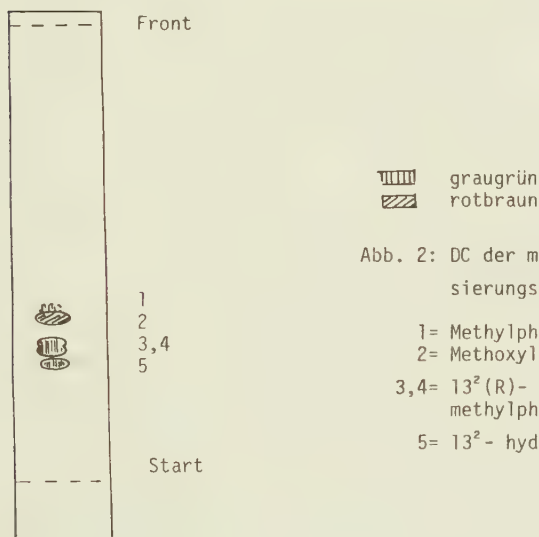


Abb. 2: DC der methylierten Allomerisierungsprodukte (System 1)

1= Methylpheid a

2= Methoxylacton

3,4= $13^2(R)$ - und $13^2(S)$ - methoxy-methylpheid a

5= 13^2 - hydroxy-methylpheid a

3.7.3. durch Metallierung (vgl. Strell 1958)

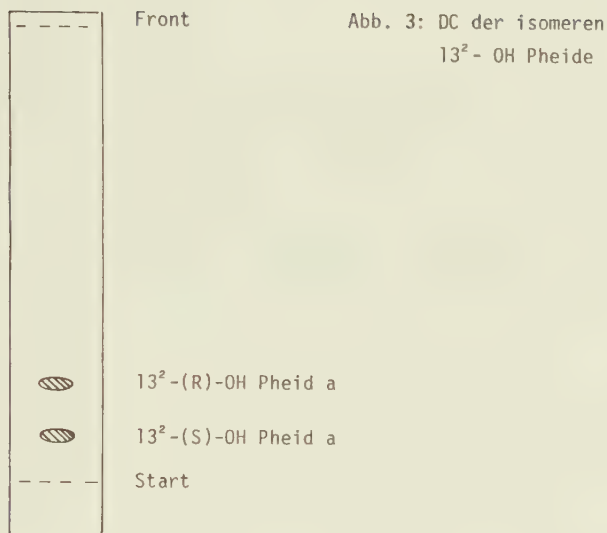
MPheid a in Chloroform wird mit einer gesättigten Lösung von Zinkacetat in Methanol versetzt und 15 min am Rückfluß in Gegenwart von Sauerstoff erhitzt. Der Ablauf der Reaktion kann am Farbumschlag verfolgt werden. Nachdem durch Waschen mit Wasser das

überschüssige Zinkacetat entfernt wurde, wird getrocknet, eingeengt und die Pigmente in Ether überführt. Es wird mit Wasser unterschichtet. Durch Zugabe von konz. HCl wird entmetalliert. Die Lösung wird noch 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Neutralwaschen und Trocknen wird über präp. DC gereinigt. Dies ist das schnellste Verfahren und zugleich das mit der höchsten Ausbeute.

3.8. Hydrolyse der Methylester

Pheophorbid a und a' wurden ebenso wie die Hydroxypheophorbide nach folgender Vorschrift dargestellt (Hynninen, 1981).

Methylpheophorbid a wird 30 min in einer Mischung aus 30%-iger HCl und dem gleichen Volumen Diethylether geschüttelt. Vor der Behandlung werden Ether und Salzsäure auf 4°C gekühlt. Die Pigmente, welche nach 30 min noch in der Etherphase waren, wurden verworfen. Die Pigmente in der HCl-Phase werden durch Verdünnen und Neutralisieren mit gesätt. NaHCO₃ in frischen Ether überführt. Nach Waschen mit Wasser und Trocknen erfolgte die Trennung über PSC (System 2). Die Reaktion verläuft quantitativ. Verunreinigungen sind nur in Spuren zu entdecken. Die Absorptionsspektren sind identisch mit dem Spektrum von Phe a.



3.9. Darstellung von Zn-13²-OH Mpheid a und der entsprechenden freien Säuren (Biere 1966)

13²-OH-MPheid a wird in Chloroform gelöst. Dann wird im überschuß eine gesättigte Lösung von Zn-acetat in Methanol zugesetzt und 10 min am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mehrmals mit Wasser gewaschen um überschüssiges Zn-acetat zu entfernen. Die Chloroformphase wird getrocknet und eingengt. Die Reinigung kann über Zuckersäule (Biere 1966) oder präp. HPLC erfolgen (System 1).

Zur Darstellung der Zn-13²-OH-Pheide a und a' wurden die jeweiligen 13²-OH-pheide als Ausgangsmaterial verwendet. Da die freien Säuren nur als Vergleichsmaterial für chromatographische Zwecke dienen sollten, war eine weitere Reinigung nicht erforderlich. Sie waren nur mit geringen Mengen Ausgangsmaterial

verunreinigt. Die Absorptionsspektren zeigen Maxima bei 426 und 656 nm (Ether). Die Reinheit wurde dünnschichtchromatographisch mit System 2 für die freien Säuren und mit System 1 für den Methylester überprüft.

4. Chromatographische Systeme

4.1. HPLC

System 1: Säule :RP 18

Pumpe A :91% MeOH

Flow : 2ml/min

System 2: Säule :RP 18

Pumpe A :91% MeOH

Pumpe B :100% Aceton, 0-70% B in 20 min

Flow : 1.5 ml/min

Gradient :6

System 3: Säule :RP 18

Pumpe A :91% MeOH

Pumpe B :100% Ethylacetat, 0-50% B in 30
min

Flow :1.5 ml/min

Gradient :9

4.2. Dünnschichtsysteme

System 1 : für analytische und präparative Trennungen

Tetrachlorkohlenstoff : Aceton 8:2

Kieselgel H

System 2 : Benzol: Ethylacetat : Ethanol: n-Propanol

Kieselgel H (Endo 1982)

System 3 : Petrolether: i-Propanol:Wasser 100:10:0.25

Kieselgel H

System 4 : nur für analytische Trennungen

MeOH : Aceton : Wasser 30:20:1

RP 8 HPTLC

5. Zellkultur

5.1. Medium und Anzucht

Verwendet wurde die Tabakzellkultur *Nicotiana Tabacum* var. Samsun. Die Suspensionskulturen wurden in einem modifizierten Medium nach Logemann und Bergmann 1970 (Murashige und Skoog 1962) gezogen. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist im Anhang angegeben. Der pH wurde auf 5.9 eingestellt und das in 300 ml Erlenmeyerkolben abgefüllte Medium 20 min bei 120°C autoklaviert. Die Temperatur im Zellkulturraum betrug 27 $\pm$ 1°C, die Luftfeuchtigkeit 85%. Die Beleuchtung erfolgte durch Dauerlicht (Osram L 58 W/21 Lumilux weiß). Alle 10 Tage wurde überimpft (10 ml alte Kultur = ca. 3 ml Zellvolumen auf 50 ml frisches Medium). Zur Gewinnung größerer Mengen Material wurde in 1 l Fernbachkolben mit je 300 ml Inhalt kultiviert.

5.2. Induktion der Seneszenz

5.2.1. Dunkelstellen bei 27°C

Nach 10-tägigem Wachstum im Dauerlicht wurden die Tabakzellkulturen im Zellkulturraum in eine lichtdichte Blechschachtel verbracht und dort bis zur Aufarbeitung belassen. Für hohe Luftfeuchtigkeit wurde durch eine mit Filterpapier ausgekleidete und mit Wasser gefüllte Glasschale gesorgt. Diese Blechschachtel wurde nur

unter Grünlicht geöffnet. Die Primula- und Campanulapflanzen wurden genauso behandelt.

5.2.2. Dunkelstellen bei 41°C

Zur Bildung von Chlorophyll-Abbauprodukten wurden die Kulturen nach 10-tägigem Wachstum in einen vollständig verdunkelten Brutschrank mit +41°C verbracht und dort für 48 bzw. 72 h inkubiert. Hohe Luftfeuchtigkeit wurde durch eine mit Wasser gefüllte Plastikschaale im Brutschrank erzeugt. Der Brutschrank wurde nur bei grünem Sicherheitslicht geöffnet.

6. Untersuchung der Pigmente aus Zellkulturen

6.1. Extraktion der Pigmente

Die Zellen werden durch Abtropfen über Gaze von Medium befreit und mit einem großen überschuß dest. Wasser gewaschen und abgenutscht. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß die Zellen nicht trocken gesaugt werden, da hierbei bereits Pigmentveränderungen auftreten können (Svec 1978). Die Zellmasse wird in einen 1l Mixbecher überführt (Waring Blendor), mit ca. 500 ml kaltem Aceton/NH₃ (500:1 v/v) versetzt, mit Stickstoff begast und 1 min mit voller Drehzahl gemixt. Das Homogenat wird in eine Fritte (G1) überführt und mit Stickstoff in ein kaltes Vorratsgefäß gedrückt. Diese Prozedur wird zweimal wiederholt.

Die vereinigten Acetonextrakte werden am Rotavapor auf

etwa die Hälfte eingeengt (vor Licht schützen, max. 20°C). Dann wird mit etwa der gleichen Menge Ether versetzt (Peroxidfrei!) und durch vorsichtiges Waschen mit bidest. Wasser die Pigmente in die Oberphase überführt. Entstehende Emulsionen können durch kleine Mengen NaCl gebrochen werden. Falls die Waschflüssigkeit noch gefärbt ist, wird mit Essigester nachextrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden über NaCl oder durch Ausfrieren getrocknet, eingeengt und unter Stickstoff bei -18°C im Dunkeln aufbewahrt. Zur Extraktion von Blättern wurde ähnlich vorgegangen: Primula-, Campanula- und Spinatblätter wurden in ca. 1 cm breite Stücke geschnitten, im Waring Blendor mit flüssigem Stickstoff übergossen und dann extrahiert. Als erstes Extraktionsmittel diente Aceton/Puffer 9:1 (Puffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2).

6.2 Die Isolierung von MPheidX

Der nach 6.1 gewonnene Rohextrakt wird mit Methylierungsgemisch (s. II.3.5.) 30 min am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die erhaltenen Methylester (MPheid a, MPheid b, MPheid X) werden gewaschen, getrocknet und eingeengt. Zum Auftragen auf präp.DC Platten wird in Chloroform aufgenommen. Die Trennung erfolgt mit System 1.

Mit einem Objektträger wird die jeweilige Bande abgeschabt und mit Methanol in einen Scheidetrichter überführt. Es wird sofort etwa das gleiche Volumen Ether zugegeben, dann wird Wasser zugesetzt bis zur

Phasentrennung. Die Etherphase wird getrocknet und eingeengt. Die MPheid X entsprechende Bande wird auf die gleiche Weise noch mehrmals gereinigt, bis auf einer analytischen HPTLC Platte keine Verunreinigungen mehr erkennbar sind.

Der letzte Reinigungsschritt erfolgt über präp. HPLC (System 1). Das so gereinigte Produkt kann für NMR und MS Messungen eingesetzt werden.

6.3 Die Isolierung von γ_1

6.3.1. Die Zweiphasenverteilung

Der Rohextrakt von Tabakzellkulturen, die drei Tage bei 41°C im Dunkeln standen (3d41°C), wird mit folgender Methode in veresterte und nichtveresterte Pigmente aufgetrennt (Griffiths 1978):

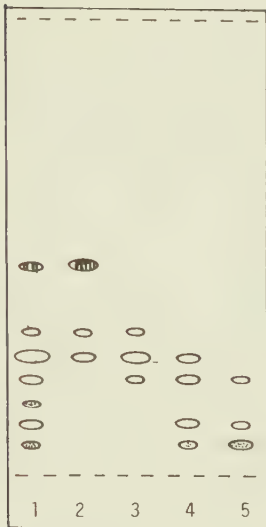
Die etherische Lösung der Pigmente wird mit dem gleichen Volumen Petrolether (40-60°C) versetzt. Dann wird 1/10 des Volumens einer Methanol: 0.01 M Ammoniak (4:1) Lösung zugesetzt. Dabei bilden sich zwei Phasen. Die untere methanolische Phase enthält die unveresterten Pigmente. Die untere Phase wird abgelassen und die Etherphase noch mehrmals mit Methanol/Ammoniak behandelt, bis kein Pigment mehr aus der Etherphase extrahierbar ist. Die vereinigten Methanolextrakte werden mit Ether/Petrolether (1:1) zurückgewaschen, um Spuren von veresterten Pigmenten zu entfernen. Die Methanolphasen werden im Vakuum (20°C) auf etwa die Hälfte des Volumens konzentriert, mit Wasser verdünnt

und mit Ether extrahiert.

Hier muß sehr schnell gearbeitet werden, da wässriges Methanol die Allomerisierungsreaktion auslöst. Als weiterer Reinigungsschritt schließt sich die Reinigung über eine Zuckersäule an.

6.3.2. Reinigung über Zuckersäule

Die Säule wird wie in 3.2. beschrieben vorbereitet. Die Pigmente werden aus PE:n-Prop. (99.5:0.5) auf die Säule aufgetragen und mit demselben Gemisch eluiert (vgl. Perkins and Roberts 1962), um restliche Carotinoide zu entfernen. Danach wird mit PE:Chloroform : i-Prop. (69.5:30:0.5) entwickelt. Dann wird mit frisch gereinigtem Chloroform eluiert und zum Schluß mit Chloroform/Methanol 1:1. Auf diese Weise werden alle Pigmente verlustfrei von der Säule gespült. Die letzte Fraktion enthält Y. Diese wird durch präp. HPLC (System 2) nachgereinigt. Für chromatographische Vergleiche wurde Y mit Diazomethan methyliert wie unter 3.5.2. beschrieben. In der folgenden Abb. sind die einzelnen Fraktionen der Zuckersäule mittels DC dargestellt.



-  grau-grün
-  gelb
-  grün

- 1 Rohextrakt einer abbauenden Kultur nach Phasenverteilung
- 2 Eluiert mit PE : n - Propanol
- 3 Eluiert mit PE : CHCl_3 : i - Prop.
- 4 Eluiert mit CHCl_3
- 5 Eluiert mit CHCl_3 : MeOH 1:1

Abb. 4: DC der Fraktionen 1-5 nach Auftrennung der unveresterten Pigmente über Zuckersäule
(System 2)

7. Die Isolierung von "Z"

7.1. Reaktionsansatz

Zu 980 ml Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4, 0.1% Triton X 100) werden unter Stickstoffbegasung 10 mg Chl a in 5 ml Ether gegeben. Sobald der Ether abgedampft ist und Chl a in der wässrigen Phase gelöst ist, werden 400 mg Linolensäure in 20 ml Ethanol zugefügt. Dieser Reaktionsansatz wird 12 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen und dann aufgearbeitet.

7.2. Aufarbeitung

Zur Abtrennung von Linolensäure und Triton X 100, welche die chromatographische Reinigung erschweren, wird eine Dioxanfällung durchgeführt (vgl. Iriyama 1979).

Vom Reaktionsansatz (1000 ml) werden 100 ml in einen 1 l Scheidetrichter überführt. Dann werden 100 ml Ether zugesetzt. Nun wird solange Aceton zugegeben, bis eine einheitliche Phase entsteht. Durch Waschen mit gesättigter Kochsalzlösung werden die Phasen getrennt und die Pigmente in Ether überführt. Die farblose wässrige Phase wird verworfen. Auf diese Weise wird der ganze Reaktionsansatz in 100 ml Anteilen ausgeethert. Die etherische Lösung wird eingeeengt und zur Dioxanfällung eingesetzt.

Die Dioxanfällung wird durchgeführt wie in 3.2.

beschrieben. Die Pigmente werden in 13 ml Aceton aufgenommen, mit 1.8 ml Dioxan versetzt und mit ca. 5 ml Wasser ausgefällt. Im Vergleich zur Fällung von Chl a ist hier ein höherer Wasseranteil nötig. Die so gereinigten Pigmente werden mit HCl entmetalliert (vgl. 3.4.), die Pheophytine werden über präp. DC gereinigt (System 1). Der Phytylester von Z (ZH+) wird 15 min mit Methylierungsgemisch umgeestert (vgl. 3.5.1.) und nochmals über präp. DC gereinigt (System 1). Die so vorbereitete Probe kann für NMR und MS Messungen eingesetzt werden.

ZH+ zeigt einen Molekülpeak bei 902, der Methylester (Zme) bei 638 (vgl. III.4.3.2.)

8. Untersuchungen von Enzymreaktionen in grünen und bei 27°C seneszierten Tabakzellkulturen

8.1. Pigmentvergleich nach Inkubation der Homogenate

Je zwei Kolben Tabakzellkultur werden durch Waschen mit bidest. Wasser über zwei Lagen Gaze von anhaftendem Schleim befreit (1l Wasser pro Kolben). Die Probe wird in drei Teile geteilt. Ein Teil wird sofort extrahiert (Aceton, Ether vgl. 6.1.) und eingeeengt. Bei quantitativen Vergleichen der Gesamtpigmentmenge wird die Extinktion im langwelligen Maximum (662 bzw. 667 nm) bestimmt. Das zweite Drittel der Probe wird mit Puffer (400 mM Mannit, 20 mM Tricine, 10 mM NaCl, pH 7.6; Markwell 1979) im 5 ml Potter gründlich

homogenisiert. Der dritte Teil wird wie der zweite homogenisiert und 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Die beiden Homogenate werden im Dunkeln im Wasserbad 2 Std. bei 33°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation werden die Proben extrahiert und die Pigmente in Ether überführt. Nach Aufnahme eines Absorptionsspektrums wird eingeengt und die Zusammensetzung der Pigmente dünnschichtchromatographisch untersucht (System 3). Die Dünnschichtplatten werden mit dem Densitometer ausgewertet.

8.2. Versuche zum Nachweis der Lipoxygenase

Der Reaktionsansatz nach IMAMURA (1974) besteht aus drei Komponenten: Rohextrakt, Chl a und Linolsäure.

a) Präparation des Rohextrakts: Verwendet wurden Weizen, Hafer und Tabakzellkulturen. Weizen und Hafer wurden im Gewächshaus angezogen und geerntet, sobald die Halme ca. 10 cm lang waren. Die Halme wurden in 1 cm lange Stücke geschnitten, mit wenig Isolierungsmedium (0.05 M Tris-HCl Puffer, pH 7.2) versetzt und im Waring Blendor 1 min bei voller Drehzahl gemixt.

Tabakzellkulturen wurden nach Waschen mit bidest. Wasser mit wenig Isolierungsmedium versetzt und ebenso zerkleinert.

Der resultierende Zellbrei wurde durch zwei Lagen Gaze gepreßt und 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Der überstand wurde als Rohextrakt eingesetzt.

b) Linolsäurelösung (Grossman et al. 1969): 1 ml

Linolsäure in Ethanol (75 mg/ml) werden mit 0.3 ml einer Lösung von Tween 80 in Ethanol (0.1 ml/ml) versetzt. Dazu werden 5.0 ml einer wässrigen EDTA Lösung (5.0 mg/ml) gegeben. Der pH wurde durch tropfenweises Zufügen einer 0.1 n NaOH Lösung auf 9.0 gebracht und das Volumen mit bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde unter Stickstoff im Gefrierfach aufbewahrt (max. 1 Woche).

c) Chl a : 3.0×10^{-4} M in Puffer (0.05 M Phosphatpuffer, pH 6.8, mit 0.2% Triton X 100)

d) Durchführung: 3 ml Phosphatpuffer, 50 μ l Linolsäurelösung und 50 μ l Chl a .lösung werden in einer Küvette vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l Extrakt gestartet. Die Extinktionsabnahme wurde bei 668 nm verfolgt.

8.3. Versuche zum Nachweis der Mg-Dechelatase

Die von Owens und Falkowski (1982) genannten Bedingungen für Diatomeen wurden auf Tabakzellkulturen übertragen. Verwendet wurden 10 d Dauerlicht (= "grüne"), 28 d Dauerlicht und 12 d dunkel gestellte (27°C) Kulturen verwendet. Die Zellen wurden in einem Glaspotter (5 ml) mit dem gleichen Volumen Tris-HCl Puffer (pH 8.0, 50 mM) homogenisiert und durch zwei Lagen Gaze gepreßt. Ganze Zellen und größere Bruchstücke wurden durch Zentrifugation (5 min, 300 g) entfernt. Der Überstand wurde zur Messung eingesetzt. Alle 20 min wurde ein Spektrum von 720 - 360 nm gefahren. Zwischen den Messungen wurden die Proben bei Raumtemperatur im

Dunkeln aufbewahrt.

9. Pigmentanalyse von dunkel gestellten intakten Pflanzen

Ende Oktober wurden eine Primel- (*Primula vulgaris*) und eine Glockenblumenart (*Campanula persicifolia*) aus dem Freiland als Versuchsobjekt entnommen. Die *Campanula* war in Tonschalen vorkultiviert, die *Primula* wurde aus dem Boden genommen und in Blumentöpfe gesetzt. Je die Hälfte der Exemplare wurde bei 27°C und bei 4°C dunkel gestellt. Im Abstand von einigen Tagen (1,14,20,22 Tage) wurden jeweils einige Blätter entnommen und extrahiert.

10. Präparation von Chlorophyll-Proteinen

10.1. aus Spinat

Folgende Puffer werden verwendet:

Die Puffer A,C,D,E wurden nach Jensen und Bassham (1966), modifiziert nach Nakatani und Barber (1977) hergestellt. Der Percoll-Gradient B wurde nach Mourioux und Douce (1981) geformt.

A. Isolierungsmedium

D-Sorbit (450 mM), BSA (2 g), HEPES (50 mM), $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (1 mM), $NaNO_3$ (1 mM), KH_2PO_4 (1mM), NaF (1 mM), Ascorbinsäure (1 mM). Der pH wird auf 7.5 eingestellt.

B. Gradientenmedium

D-Sorbit (450 mM), HEPES (50 mM), $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (5 mM)

Herstellung des Gradienten (5-80% Percoll):

Pro Gradienten Röhrchen (20 ml) werden 10 ml einer 5%-igen Percoll-Lösung und 10 ml einer 80%-igen Percoll-Lösung (Percoll in Gradientenmedium) mittels eines linearen Gradientenmischers und einer Schlauchpumpe zusammengemischt.

C. HEPES-Puffer

HEPES (50 mM), KH_2PO_4 (4 mM), $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (10 mM), NaF (10 mM), Ascorbinsäure (2 mM), pH 7.5

D. Tricine-Puffer

0.05 M Tricine, pH 8.0

E. Probenpuffer

Tris (50 mM), Glycin (50 mM), SDS (0.5%), Glycerin (10%), pH 8.3

80 g Spinatblätter werden im grünen Sicherheitslicht in ca. 1 cm breite Stücke geschnitten und in einem Mixer mit dem doppelten Volumen Isolierungsmedium (bezogen auf das Frischgewicht) kurz zu einem homogenen Brei gemixt. Der Zellbrei wird durch ein Nylontuch vorsichtig in ein gekühltes Becherglas gepreßt. Das Filtrat wird in vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und 15 min bei 3000 g in der Kältezentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert und das Pellet behutsam in 4 ml Gradientenmedium resuspendiert. Die Suspension wird nun auf den vorgeformten Percollgradienten aufgetragen und bei 4500 Upm 45 min in der Kälte zentrifugiert. Die Chloroplastenbande wird

mit einer Pasteurpipette abgenommen, mit dem doppelten Volumen Gradientenmedium versetzt und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert.

Das Pellet wird in insgesamt 5 ml HEPES Puffer (osmot. Schock) aufgenommen und in einem Potter gut homogenisiert. 100 μ l werden zur Chlorophyll Bestimmung (nach Arnon 1949, siehe Anhang) abgenommen. Anschliessend wird 15 min bei 20000 Upm (=40000 g) in der K $\ddot{u}$ hlzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird in insgesamt 2 ml TRICINE Puffer resuspendiert und in Eppendorf- H $\ddot{u}$ tchen $\ddot{u}$ berf $\ddot{u}$ hrt. Es erfolgt erneute Zentrifugation bei 20000 Upm f $\ddot{u}$ r 15 min.

Das Pellet wird mit der zuvor berechneten Menge an Probenpuffer (SDS:Chl 20:1) versetzt und im Eisbad 3 min resuspendiert.

Es wird nochmals bei 20000 Upm f $\ddot{u}$ r 20 min zentrifugiert. Der gr $\ddot{u}$ ne $\ddot{u}$ berstand enth $\ddot{a}$ lt die gel $\ddot{o}$ sten Chlorophyll Proteine. Er wird abpipettiert und nach Zugabe von einiger K $\ddot{o}$ rnchen DTT zur Elektrophorese eingesetzt.

10.2. aus gr $\ddot{u}$ nen Tabakzellen

Zur Isolierung von Chloroplasten erwies sich die Methode nach Sato (1977) als geeignet:

Die Zellen werden geerntet (zwei Kolben je 60 ml), auf einem Nylontuch mit ca. 1 l bidest. Wasser gewaschen und mit ca. 20 - 30 ml Isolierungsmedium (20 mM Phosphatpuffer, pH 7.5, 0.4 M Sorbit, 5 mM MgCl $_2$, 5mM Na EDTA, 0.06% BSA) im M $\ddot{o}$ rser zerkleinert. Das Homogenat

wird über 4 Lagen Gaze abgepreßt um ganze Zellen und größere Bruchstücke zu entfernen. Das Filtrat wird 5 min bei 300 g abzentrifugiert. Der überstand wird 2 min bei 5000 g zentrifugiert.

Der Niederschlag wird in 5 ml Homogenisierungsmedium aufgenommen und auf eine Sephadex G 50 (coarse) Säule aufgebracht, welche vorher mit Homogenisierungsmedium äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Homogenisierungsmedium eluiert (Flußrate 1.5 ml/min). Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler in 3 ml Portionen aufgefangen. Die grün gefärbten Fraktionen werden vereinigt und 10 min bei 40000 g abzentrifugiert, nachdem ein Aliquot zur Chlorophyllbestimmung abgenommen worden war. Das Pellet wurde mit Probenpuffer (vgl. 10.1.) solubilisiert und erneut 20 min bei 40000 g abzentrifugiert. Der grüne überstand wird zur Elektrophorese eingesetzt.

10.3 aus abbauenden Tabakzellkulturen

Abbauende Chloroplasten konnten nach Sato (1977) nicht isoliert werden. Es wurden deshalb eine ganze Reihe anderer Zerkleinerungsmethoden geprüft:

a) Schockgefrieren: Die Tabakzellen werden geerntet, über ein Nylontuch gewaschen (ca. 1 l bidest Wasser für 60 ml Zellkultur), und dann für 10 min in flüssigen Stickstoff getaucht. Nach dem Auftauen wird mikroskopisch untersucht. Mehr als 90% der Zellen sind nach dieser Behandlung noch intakt.

b) Zerkleinerung im 30 ml Potter: Die gewaschenen Zellen werden in wenig Puffer (A, vgl. 10.1) aufgenommen und 1 min homogenisiert. Auch hier sind die meisten Zellen mikroskopisch noch intakt.

c) Zerkleinerung im 5 ml Potter: 2 ml gewaschene Zellen werden in 2 ml Puffer (A) stark gepottent (ca. 50 Auf- und Ab- Bewegungen). Im Mikroskop ist zu erkennen, daß der größte Teil der Zellen aufgebrochen ist.

d) Zerkleinerung mit French Press: Ca. 5 ml gewaschene Zellen werden mit Puffer versetzt und im 30 ml Potter homogenisiert. Das Homogenat wird mit der French Press bei 800 atm weiter aufgeschlossen. Mikroskopisch sind jetzt keine ganzen Zellen mehr erkennbar, sondern nur noch Bruchstücke verschiedener Größe.

e) Zerreiben im Mörser: Ca. 5 ml Zellen werden mit wenig Puffer (A) und einer Spatelspitze gereinigtem Seesand 3 min kräftig homogenisiert. Im Mikroskop sind etwa 50 % geknackte Zellen zu beobachten.

f) Behandlung mit Cellulysin (Murashige et al. 1974):
100 mg Cellulysin werden in 10 ml Phosphatpuffer (66 mM, pH 5.7) gegeben. 100 mg gewaschene Tabakzellkultur werden mit 1 ml Enzymlösung versetzt und 90 min bei 27°C inkubiert. Im Mikroskop sehen die Zellen unverändert aus.

Als geeignetste Methoden, um abbauende Zellen zu zerkleinern, erwies sich für kleine Mengen der 5 ml Potter, für größere Mengen die Reibschale als geeignet.

Beim Versuch, aus den mit dem 5 ml Potter bzw. der Reibschale gewonnenen Homogenaten abbauende Chloroplasten über die Sephadexsäule anzureichern, wurde eine sehr geringe Ausbeute an intakten Chloroplasten mit Chlorophyllspektrum erhalten. Pheophytinhaltige Partikel konnten von der Säule nicht eluiert werden.

Zur Gewinnung von Chlorophyll-Proteinen aus abbauenden Chloroplasten wurde deshalb folgendermaßen vorgegangen: Die Zellen wurden in der Reibschale zerkleinert, durch ein Nylontuch gepreßt und 2 min bei 300 g abzentrifugiert. Der überstand wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde sofort zur Solubilisierung eingesetzt.

11. Elektrophoretische Systeme

Alle Untersuchungen wurden mit Poly-acrylamid-gelelektrophorese durchgeführt. Folgende Systeme wurden in Bezug auf ihre Eignung zur Auftrennung von Chlorophyll-Proteinen miteinander verglichen:

- a) Benz (unveröffentlicht, modifiziert nach Maurer 1968)
- b) Markwell et al. (1978)
- c) Lichtenthaler et al. (1981)
- d) Bricker et al. (1980)

Die Durchführung der Elektrophorese nach a) ist hier exemplarisch geschildert, die anderen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Folgende Lösungen werden benötigt:

Obergel:

2.5% an Acrylamid

Tris-HCl Puffer, 1 M, pH 7.5	1.0 ml
TEMED (5%)	0.1 ml
Deriphat (10%)	0.08 ml
Acrylamid (10%) (10 g + 2.5 g Bis-acrylamid/100 ml)	2.0 ml
Riboflavin (4 mg/100 ml)	1.0 ml
Saccharose (40 g/100 ml)	3.82 ml

Polymerisiert wurde mit UV-Licht

Trenngel (10 - 20% Gradientengel):

	10%	20%
Tris-HCl Puffer (1 M, pH 8.8)	7.5 ml	7.5 ml
bidest. Wasser	5.18 ml	5.43 ml
Deriphat 160 (10%)	0.2 ml	0.2 ml
Acrylamid (30 bzw. 60%)	6.67 ml	6.67 ml
Persulfat (1.5%)	0.3 ml	0.13 ml
TEMED (5%)	0.15 ml	0.07 ml

Elektrodenpuffer (pH 8.3):

Tris (12,4 mM), Glycin (96 mM), Deriphat (0,2%)

Solubilisierungspuffer:

Es wurden sowohl verschiedene Detergentien als auch unterschiedliche Detergenz:Chlorophyll Konzentrationen geprüft. Die Daten sind in der Tabelle aufgeführt.

Tris (5 mM), Glycin (48 mM), Detergenz (0.5%), Glycerin (10%), pH 8.3

Tabelle 1: Elektrophorese - Systeme

Obergel	Trenngel	Solubilisierung	Methode
2.5%	10 - 20%	2:1 SDS	a)
3.0%	10 - 20%	40:1 SDS	a)
3.0%	10%	40:1 SDS	c)
3.0%	10%	20:1 LDS:OGP	c)
		2:1	
4.0%	8%	20:1 SDS	d)
-	5%	10:1 SDS	b)
-	5%	10:1 LDS	b)
-	5%	20:1 LDS:OGP	b)
		2:1	

III. Ergebnisse und Diskussion

1. Beschreibung des verwendeten Systems

Als Modellsystem zum Studium des Chlorophyll-Abbaus wurde die Zellkultur von *Nicotiana tabacum* var. Samsun verwendet. Gegenüber intakten Pflanzen aus Gewächshaus- oder Freilandkulturen bietet die Zellkultur die Vorteile der Unabhängigkeit von der Jahreszeit und der leichteren Manipulierbarkeit.

Sie wachsen als Suspensionkultur relativ rasch und können bereits nach 10 Tagen geerntet werden. Probeentnahme und Substratzusatz sind ohne Gewebsverletzung möglich. Das Medium von Murashige und Skoog (1962), modifiziert nach Logemann (1974) wurde dahingehend geändert, daß zusätzlich 100 µg Kinetin pro Liter zugesetzt wurden. Die Kalluskultur ist zwar Kinetinautotroph (Logemann 1974), trotzdem stellte sich heraus, daß im Medium mit Kinetin die Zellen besser wachsen.

Der Abbau von Chlorophyll wurde durch Dunkelstellen bei 41°C für 48 h (Abbaubedingungen A) induziert. Bei niedrigeren Temperaturen, z.B. bei 27°C sind die Effekte die gleichen, nur treten sie wesentlich später auf (ca. 10 Tage, Blank 1983).

Anschliessend wurden die Pigmente extrahiert (siehe II. 6.1) und spektroskopisch und chromatographisch näher charakterisiert. Für die Gewinnung von "Y" wurden die Zellen drei Tage bei 41°C belassen (Abbaubedingungen B).

Gelegentlich wurden auch Kulturen, die zu lange im Licht standen und aus Nährstoffmangel seneszierten, untersucht.

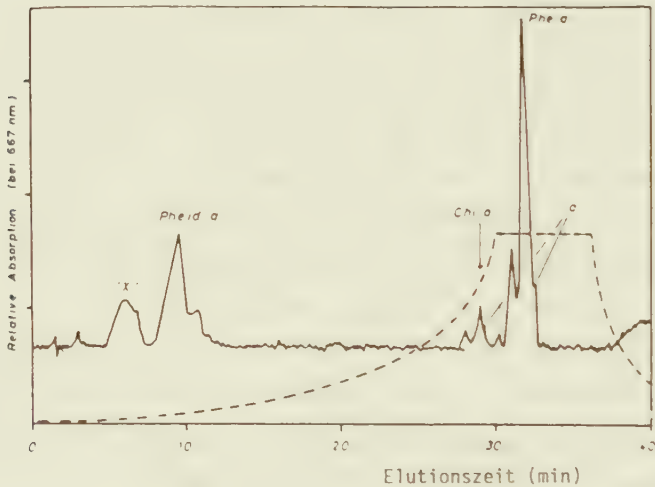


Abb. 5: HPLC Chromatogramm des durch Abbaubedingungen A gewonnenen Rohextraktes aus Tabakzellkulturen (System 3)

Die ersten Hinweise darauf, daß bei Dunkelinkubation (2d41°C) ein strukturell unterschiedliches Chlorophyll entsteht, brachte die HPLC-Analyse der Extrakte. Bei einer Retentionszeit von 6.9 min tritt ein Produkt auf, welches deutlich polarer ist als Pheophorbid a (Vielwerth 1982). Dieses Produkt war der erste Gegenstand dieser Untersuchung.

2. Das Pigment "X"

2.1. Absorptionsspektrum des Rohextraktes

Vom Rohextrakt von grünen (10 Tage Dauerlicht) und abbauenden Tabakzellkulturen (2d41°C) wird ein Absorptionsspektrum in Ether aufgenommen.

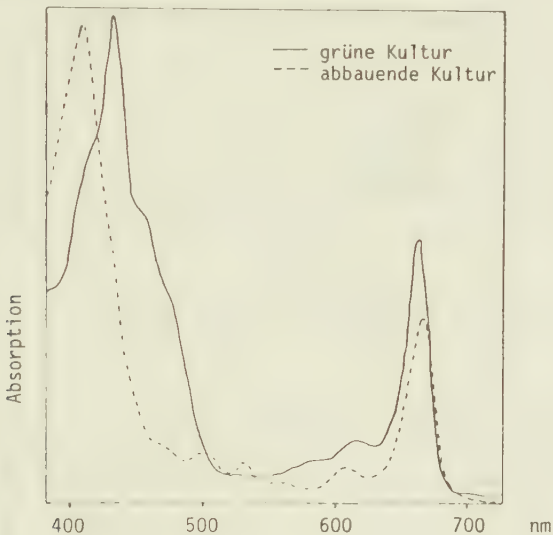


Abb. 6: Absorptionsspektren von Pigmenten aus
grünen und abbauenden (2d41°C)
Tabakzellkulturen in Ether

Während beim Rohextrakt aus grünen Tabakzellkulturen die Maxima bei 430 und 662 nm liegen, treten beim Rohextrakt aus abbauenden Tabakzellkulturen die Hauptabsorptionen bei 409 und 667 nm auf, verbunden mit den für Pheophytine und Pheophorbiden charakteristischen Banden bei 505 und 535 nm. Es muß deshalb davon ausgegangen werden, daß die Hauptmenge

der Pigmente als metallfreie Derivate vorliegt.

2.2 Chromatographisches Verhalten

2.2.1 Dünnschichtchromatographie

Die bereits erwähnten Beobachtungen, daß es sich bei X um ein metallfreies, unverestertes Pigment handeln könnte, wurden durch DC bestätigt.

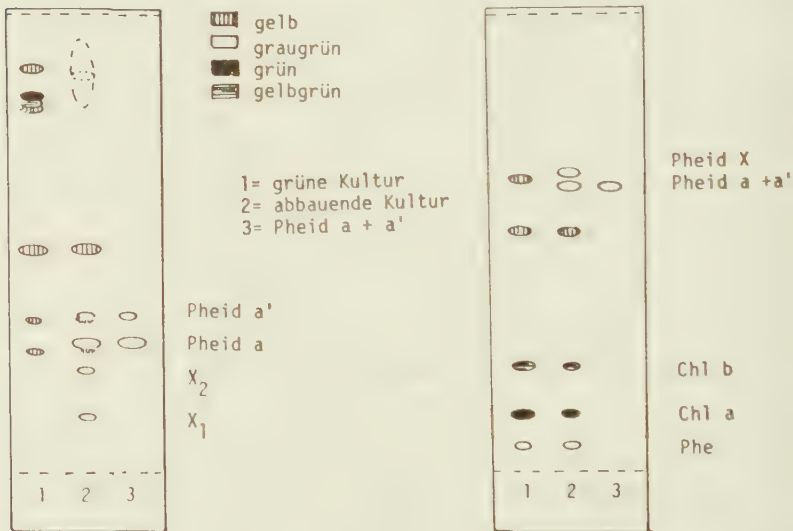


Abb. 7a: DC des Rohextraktes aus grünen und abbauenden Tabakzellkulturen (System 2)

Abb. 7b: DC des Rohextraktes aus grünen und abbauenden Tabakzellkulturen (System 4)

In Abb. 7 sind auf zwei unterschiedlichen DC Systemen grüne und abbauende Proben einander gegenübergestellt. Pheid a und Pheid a' sind als Vergleich mit

aufgetragen. System 2 (Abb. 7a) zeigt eine besonders gute Trennung im Bereich der unveresterten Pigmente: deutlich erkennbar sind zwei Flecke, deren Rf darauf schliessen läßt, daß sie polarer sind als Pheid a.

Die Substanzen sind in Abb. 7 mit X₁ und X₂ bezeichnet, im weiteren Verlauf der Untersuchung stellte sich heraus, daß es sich um Isomere von "X" handelt (vgl. Pheid a und a'). Die Carotinoide wurden anhand ihrer Farbe als solche identifiziert.

Die Reihenfolge der Pigmente ist die gleiche wie im HPLC-Chromatogramm in Abb. 5. System 4 trennt besonders gut im Bereich der Phytylester, die unveresterten Pigmente haben hier einen hohen Rf-Wert.

2.2.2. Chromatographie der Methylester

Da die Methylpheide wesentlich leichter zu handhaben sind als die Pheophorbide, stellte sich die Frage nach der Methylierbarkeit von X. Durch eine Behandlung mit Methylierungsgemisch würden außerdem Chlid a, Pheid a und Phe a zu Methylpheid a umgesetzt, so daß sich eine Vereinfachung des Pigmentmusters ergeben würde. Beim Auftreten eines zusätzlichen Methylpheophorbids müßte es sich dann um MethylpheidX handeln.

Grüne und 2d410C Tabakzellkulturen wurden also entsprechend II.3.5.1. methyliert. Nach Abkühlung, Neutralwaschen und Einengen wurde durch DC und HPLC aufgetrennt.



- 46 -

Abb. 8: HPLC-Chromatogramm eines methylierten Rohextraktes aus abbauenden Tabakzellkulturen



Abb. 9 :
DC chromatogramm von methylierten Rohextrakten aus grünen und abbauenden Tabakzellkulturen

1= grüne Kultur methyliert
2= abbauende Kultur methyliert
3= Pyromethylpheid a
System 1

In Abb. 9 wurde zum Vergleich Pyromethylpheid a mit aufgetragen.

Die Chromatogramme zeigen, daß durch Methylierung ein von Methylpheid a unterschiedliches MethylpheophorbidX entstanden ist. Es handelt sich nicht um Pyromethylpheid a (Pyropheophytin wird von Schoch et al. 1981 als Abbauprodukt von dunkel gestellter Euglena beschrieben). Es kann sich auch nicht um ein Artefakt der Aufarbeitung handeln, da es sich sonst im methylierten Extrakt aus grünen Tabakzellkulturen ebenfalls nachweisen lassen müßte.

2.3. Herstellung, Trennung und Reinigung der Methylester

Die Gesamtpigmentmenge pro Anzuchtkolben sinkt während der Dunkelinkubation von ca. 150 µg auf 130 µg, davon sind ca. 10% "X" (Blank 1983).

Nachdem eine genügend große Menge Ausgangsmaterial angezogen worden war, wurden die Pigmente wie beschrieben (II.6.2.) extrahiert, methyliert und über präparative Schichtchromatographie (System a) getrennt. Die MethylpheidX entsprechende Bande wird noch mehrmals rechromatographiert, bis sich eine einheitliche Zone ergibt. Dabei ist auf besondere Reinheit der verwendeten Chemikalien zu achten, da bei der geringen Menge an Material (zur ersten NMR-Messung standen etwa 200 µg MethylpheidX zur Verfügung) bereits geringe Verunreinigungen die Interpretation der NMR- und Massenspektren stark stören.

Alle Lösungsmittel wurden deshalb am gleichen Tag frisch destilliert, die DC-Platten wurden vor der eigentlichen Trennung zweimal in sehr sauberen Kammern (kein Schliffett!) entwickelt, um eventuelle Verunreinigungen aus dem Kieselgel auszuschließen.

Vom gereinigten Methylester werden ein Absorptions-, Massen- und Kernresonanzspektrum angefertigt.

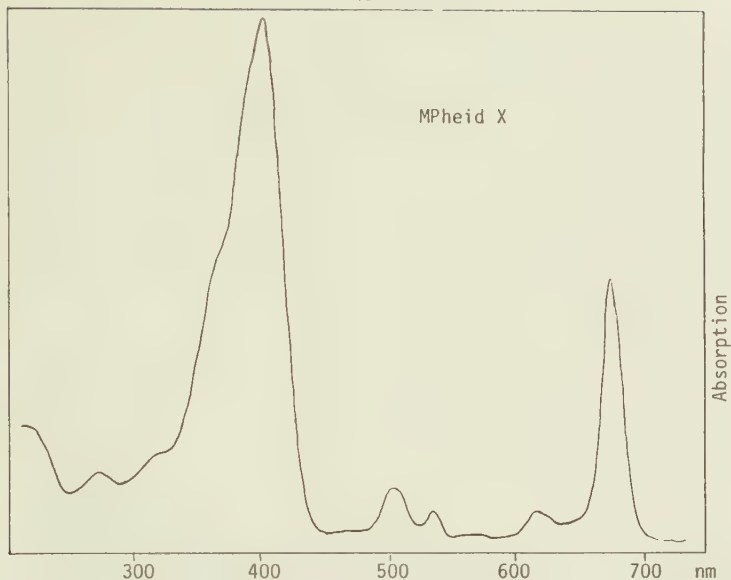


Abb. 10: Absorptionsspektrum von MethylpheidX in Ether

Das Absorptionsspektrum von MethylpheidX unterscheidet sich nicht von einem Pheophytin a Spektrum, auch hier sind die typischen Banden bei 409 (1.99), 505 (0.22), 535 (0.22), und 667 (1.0) nm vorhanden (in Klammern die relativen Intensitäten).

2.4. Synthese von 13²-Hydroxy-Methylpheida

Nachdem das chromatographische Verhalten eine größere Polarität von MethylpheidX gegenüber Methylpheida zeigt, der Chromophor jedoch im wesentlichen unverändert sein muß, wie das Absorptionsspektrum nahelegt, wurde die vermutete Verbindung 13²-Hydroxy-Methylpheid a synthetisiert. In einem Zweistufenprozeß wurde zuerst die entsprechende 13²-Acetoxy-Verbindung dargestellt und durch anschließende Verseifung mit

80%-iger Schwefelsäure die Hydroxyverbindung gewonnen (Fischer et al. 1934b). Durch die recht drastischen Verseifungsbedingungen wird der größte Teil des eingesetzten Materials zerstört, die Ausbeute ist demzufolge sehr schlecht. Deshalb wurde nach anderen Möglichkeiten der Darstellung gesucht.

Dabei bot sich die Methode der Allomerisation an (Pennington 1967). Als Nebenprodukte treten dabei vor allem das 13²-Methoxyderivat und das 13²-Methoxylacton auf. Eine noch elegantere Methode ergab sich bei der Literatursuche zu dem später behandelten Zn-13²-Hydroxy Methylpheida. Strell (1958) erkannte, daß beim Versuch, Methylpheophorbid a durch Zink zu metallieren (in Gegenwart von Luftsauerstoff) zu etwa 50% das entsprechende Zn-13²-Hydroxy-Methylpheid entsteht. Durch anschliessende Entmetallierung kann 13²-Hydroxy-Methylpheid a in befriedigender Ausbeute erhalten werden.

2.5. Massenspektren von MethylpheidX und

^{13}C -Hydroxy-Methylpheid a

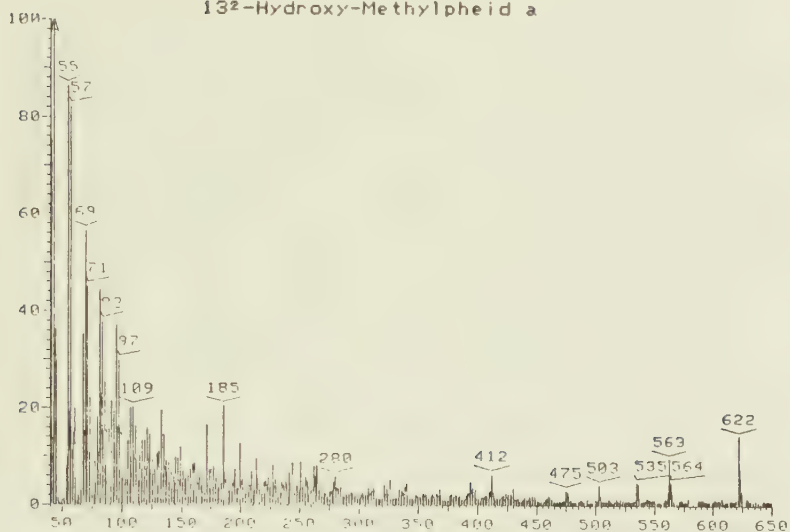


Abb. 11: Massenspektrum von MethylpheidX

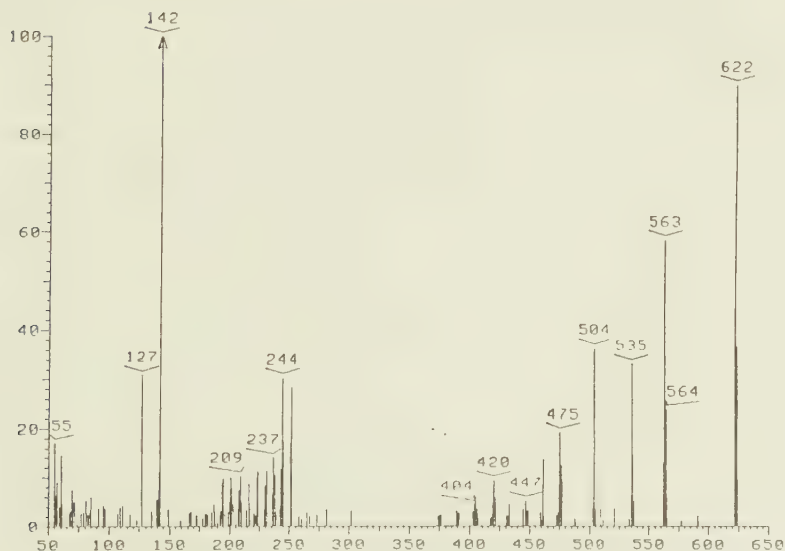


Abb. 12: Massenspektrum von ^{13}C -Hydroxy Methylpheid a

In Abb. 11 und 12 sind die Massenspektren von MethylpheidX und 13²-Hydroxy-Mpheid a wiedergegeben. MethylpheidX zeigt einen Molekülpeak bei 622. Das Molekulargewicht ist damit um 16 Einheiten höher als bei Methylpheid a und stimmt mit dem von 13²-Hydroxy Methylpheid a überein. Als Hauptabsplattungen treten auf M-59 ($-\text{CO}_2 \text{CH}_3$) und M-87 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2 \text{CH}_3$). Beide sind typisch für Methylpheophorbide (Budzikiewicz 1978). Erwartungsgemäß ist die Absplattung am exocyclischen Ring prozentual höher als bei Methylpheid a, verursacht durch das quartäre 13²-C-Atom (M-59 mit 65%, bei Methylpheid a 15% vgl. Tabelle). In der folgenden Tabelle sind die relativen Intensitäten der Absplattungen von Methylpheid X, 13²-Hydroxy-Mpheid a und Methylpheid a einander gegenübergestellt:

Tabelle 2: Relative Intensitäten der Fragmente

M-	MPheidX	13 ² -OH MPheid a	MPheid a
	622 (M ⁺)	622 (M ⁺)	606 (M ⁺)
59	67	65	15
87	32	37	7
118	13	40	-
147	20	21	25
161	11	15	6
175	9	6	-
189	5	5	-

Die für Methylpheophorbide typischen Abspaltungen M-59 und M-87 sind bei allen drei Proben vorhanden. Das Molekulargewicht von MethylpheidX ist um 16 Einheiten höher als bei Methylpheid a und stimmt mit dem von 13²-Hydroxy-Methylpheid a überein.

2.6. Kernresonanzspektren

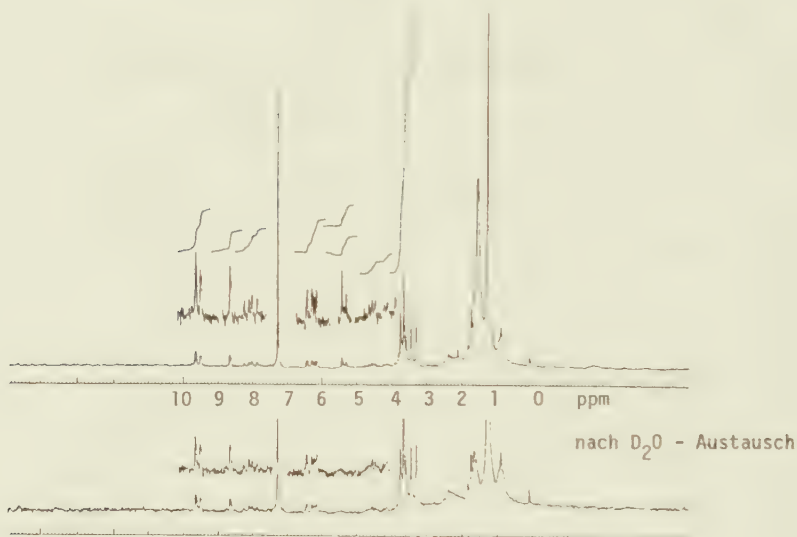


Abb. 13: NMR Spektrum von Methylphaid x

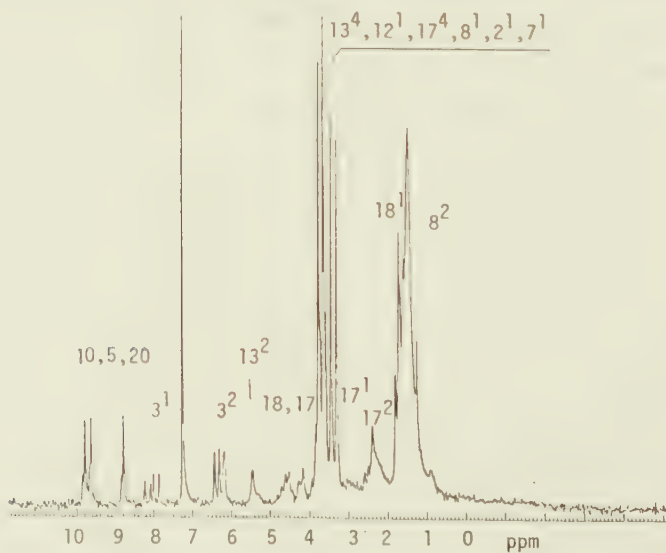


Abb. 14: NMR Spektrum von 13^2 -Hydroxy Methylphaid a

Die NMR-Daten von Methylpheid a , MethylpheidX und $^{132}\text{-OH-Methylpheid a}$ sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. In der letzten Spalte sind die Literaturodaten von $^{132}\text{-Hydroxy-Methylpheid a}$ (Endo 1982) angegeben. Die Klammern bedeuten schlechte Auflösung der entsprechenden Protonen. Die Nomenklatur und Protonenbezeichnung ist aus Abb.15 ersichtlich. Die chemischen Verschiebungen von Methylpheid a und $^{132}\text{-Hydroxy Methylpheid a}$ sind im wesentlichen identisch. Der Methylbereich zeigt die gleiche Anzahl Methyl- und Methoxygruppen, die Lage der tieffeldverschobenen Methinprotonen ist sehr ähnlich. Die geringen Unterschiede lassen sich durch die Tatsache erklären, daß die chemischen Verschiebungen der Protonen von Porphyrinen Konzentrationsabhängig sind (Closs et al. 1963).

Der Hauptunterschied vom MethylpheidX und $^{132}\text{-Hydroxy Methylpheid a}$ zu Methylpheid a ist die Abwesenheit der C- 132 Protonen Resonanz bei 6.22 ppm im Spektrum von MethylpheidX und dafür das Auftreten eines neuen Peaks bei 5.33 ppm. Das für diese Resonanz verantwortliche Proton wird bei Zugabe von D_2O sofort ausgetauscht, im Gegensatz zum C- 132 -Proton, welches Stunden für einen kompletten Austausch benötigt (Dougherty 1965).

Tabelle 3 : Zusammenfassung der NMR Daten

Proton	MPheid a	MPheidX	13 ² -OH MPheid a	Literatur- werte
10	9.32	9.63	9.78	9.57
5	9.15	9.47	9.62	9.43
20	8.50	8.60	8.78	8.61
3 ¹	7.85	8.05	8.10	7.99
3 ²	6.12	6.36	6.36	6.28
3 ²	6.04	6.32	6.20	6.18
13 ²	6.22	-	-	-
13 ² \	-	5.37	5.45	5.33
18	4.40	4.65	4.55	4.73
17	4.13	4.34	4.22	4.47
13 ⁴	3.88	3.74	3.70	3.71
12 ¹	3.62	3.82	3.60	3.64
17 ⁴	3.57	3.66	3.58	3.56
8 ¹	3.48	()	()	()
2 ¹	3.32	3.48	3.45	3.41
7 ¹	3.05	3.38	3.30	3.23
17 ¹ , 17 ²	≈2.4	≈2.3	2-3	2.1-2.4
18 ¹	1.82	()	()	1.74
8 ²	1.60	()	()	1.65

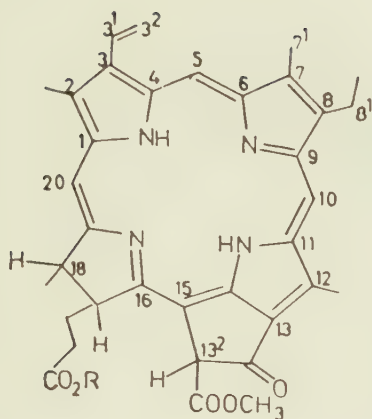


Abb. 15: Methylpheid a ($R=CH_3$)
Zur Erleichterung der
Zuordnung der NMR-
Daten wurde die Zähl-
weise mit angegeben

2.7. Chromatographischer Vergleich der Methylester

Die Tatsache, daß es sich bei MethylpheidX um 13²-Hydroxy Methylpheid a handelt wurde auch durch Cochromatographie bestätigt. In der folgenden Abb. sind auf Spur 3 MethylpheidX und 13² Hydroxy-Methylpheid a zusammen aufgetragen, es ergibt sich nur ein einziger Fleck. Zum Vergleich ist Methylpheid a mit aufgetragen.

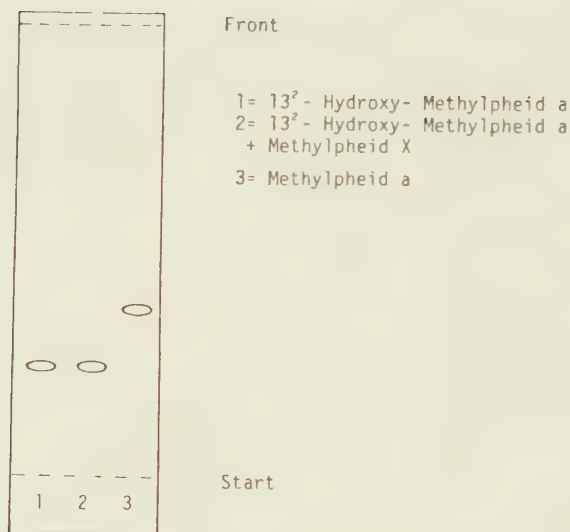


Abb. 16: Cochromatographie der Methylester (System 1)

2.8. Chromatographischer Vergleich der Pheophorbide

Der bisherige Gang der Untersuchung beschäftigte sich mit den Methylestern, da diese wesentlich leichter zu handhaben sind als die entsprechenden freien Säuren.

Da in den Zellkulturen jedoch die freien Säuren vorliegen, war es nötig einen Nachweis auf der Stufe der Säuren zu führen.

Da in Tabakzellkulturen (2d419C) zwei Produkte auftreten, welche polarer sind als Pheid a (X_1 und X_2), war es von Interesse, die Frage der optischen Isomeren näher zu untersuchen.

Auf den ersten Blick erschien es unwahrscheinlich, daß zwei Produkte, welche sich chromatographisch so

deutlich auftrennen lassen, sich lediglich in der absoluten Konfiguration unterscheiden sollten.

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Säuren durch Hydrolyse der Methyl ester dargestellt, mit System 2 aufgetrennt und mit dem Rohextrakt aus abbauenden Tabakzellkulturen verglichen.

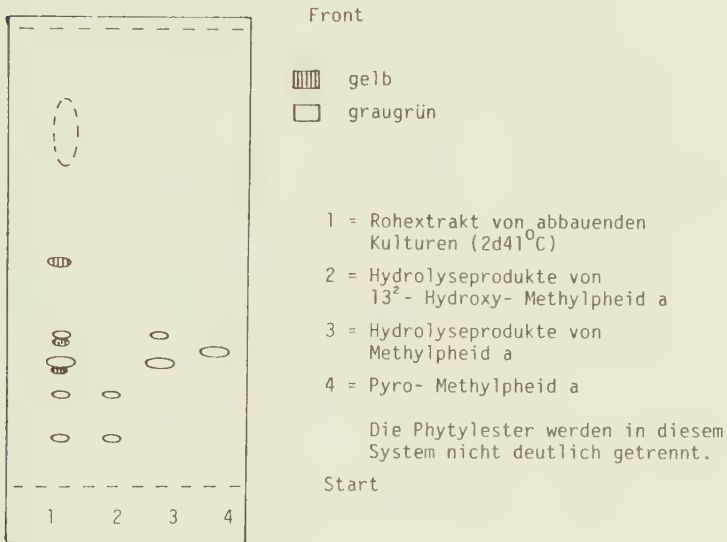
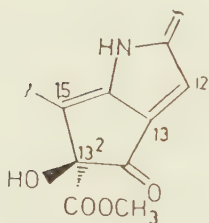


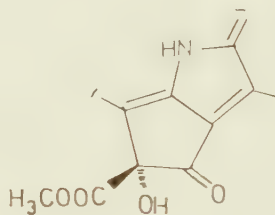
Abb. 17: Vergleich des Rohextraktes aus abbauenden (2d41°C) Zellkulturen mit verschiedenen Pheophorbiden

Die Analyse zeigt, daß jeweils zwei Produkte entstehen, mit Ausnahme von Pyromethylpheid, welches nur Protonen in Position C-13² trägt. Durch Methylierung mit Diazomethan lassen sich die Ausgangsprodukte wieder erhalten. Die beiden Hydrolyseprodukte sind folglich die Positionsisomeren am 13²- C-Atom. Beide sind in

abbauenden Tabakzellkulturen enthalten. Der zunächst überraschend erscheinende Unterschied in den Rf-Werten kann also durch die hohe Trennleistung des verwendeten Systems erklärt werden. Das gleiche gilt für Pheid a und a'. Die beiden isomeren Pheide sind ebenfalls im Rohextrakt vorhanden.



13²- (S)-



13²- (R)-

Hydroxy- Methylpheid a

Abb. 18: Positionsisomere

2.9 CD-Spektroskopie

Die Frage, welche absolute Konfiguration bei den einzelnen Isomeren vorliegt, konnte durch CD-Spektroskopie geklärt werden.

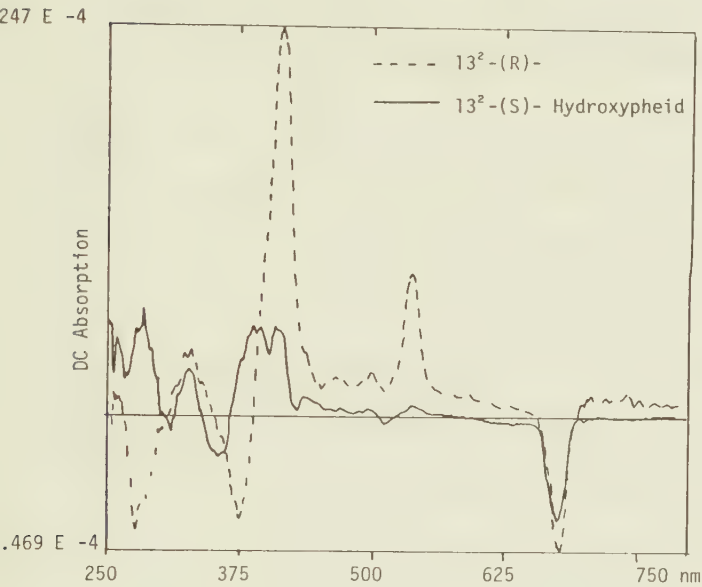


Abb. 19: CD-Spektren der isomeren 13²-Hydroxy Pheide

Die CD-Spektren von 13²-Hydroxy Pheid a und a' sind deutlich voneinander unterschieden. Bei 325, 410 und 535 nm haben beide ein positives Signal. Die Intensitäten sind jedoch bei 410 und 535 nm für a' deutlich höher. Außerdem ist beim ProduktX eine Feinstruktur des Signals bei 410 nm zu erkennen. Die Vorzeichen der Signale bei 533 und Die Vorzeichen der

Signale bei 533 und 667 nm sprechen dafür, daß die Position der 17 und 18 Protonen bei beiden Isomeren unverändert ist im Vergleich zu authentischem Chl a.

Unterhalb 300 nm sind die Vorzeichen der Signale bei beiden Isomeren verschieden. Das Vorzeichen des Signals bei 280 nm wird von der Stellung des OH-Substituenten beeinflußt. Im Fall der 13^2 -(S)-Konfiguration ist dieses Signal positiv (vgl. Wolf, Scheer 1973).

Der Vergleich mit Literaturdaten zu isomeren Pheophorbiden (Hynninen, Sievers 1981), mit denen große Übereinstimmung besteht, zeigt, daß es sich beim Isomeren mit dem niedrigeren Rf-Wert (vgl. Abb. 17) um die Verbindung mit der "natürlichen" 13^2 -(S)-Konfiguration handeln muß. Die "natürliche" Konfiguration ist bei Chl a 13^2 -(R)-, ersetzt man das Proton an C-13² durch eine Hydroxy Gruppe, so ändert sich die Nomenklatur in 13^2 (S), obwohl die Stellung der CO₂CH₃Gruppe dieselbe ist.

2.10. Diskussion

Neben Pheophorbid a und a' konnte in abbauenden Tabakzellkulturen ein zusätzliches Pigment "X" beobachtet und identifiziert werden. Durch Massenspektrometrie, Kernresonanzspektrometrie, Absorptions- und CD-Spektren sowie durch Chromatographie konnte es als 13^2 -Hydroxy Pheophorbid a charakterisiert werden, welches sowohl in der 13^2 -(R)- als auch in der 13^2 -(S)-Konfiguration in Extrakten aus Zellkulturen gefunden wurde.

Während der Aufarbeitung wurde keine weitere Isomerisierung beobachtet. Einige frühere Arbeiten berichten über das Auftreten von Hydroxy-Chlorophyll Derivaten. Endo (1982) berichtet von einem 13²-Hydroxy Pheid in alkoholbehandelter Chlorella (60% EtOH für 48 Std.). Pennington (1967) und Hynninen (1981) berichten über die chemische Allomerisation von Chl a, ein bereits seit langem bekanntes Phänomen, zuerst beschrieben von Molisch (1896) und Willstätter (1913) und später im Arbeitskreis um Fischer (1934) untersucht. Holt (1958) gewann Hydroxy Chl a Derivate durch Oxidation mit Benzochinon. Pennington (1967) beschreibt eine "enzymatische" Reaktion (Behandlung mit 100% Aceton in reinem Sauerstoff), bei der oxidierte Chlorophylle entstehen, macht aber keine Aussagen über metallfreie oder unveresterte Derivate.

Die Daten des aus Tabakzellkulturen isolierten Produktes stimmen mit den von Endo ermittelten Daten überein. Die bisher geschilderten Verfahren zur Gewinnung von Chlorophyll-Abbauprodukten waren entweder rein chemischer Natur oder zumindest recht unphysiologisch. Erst in jüngster Zeit (Maunder 1983) wird ein 13²-Hydroxy Chl a als Abbauprodukt unterquasi physiologischen Bedingungen diskutiert (Dunkelinkubation abgeschnittener Primärblätter von Gerste und Bohne bei 25°C).

Sollte das beschriebene "X" durch enzymatische Reaktionen entstanden sein, so müssen in Tabakzellkulturen zumindest zwei abbauende Enzymsysteme vorhanden sein (Oxidase und Chlorophyllase). In der Tat

legt die Beobachtung von Barnett (1962) (Bildung eines "atypical Chl *a*") eine oxidative Aktivität als Nebenreaktion der Chlorophyllase nahe.

3. Isolierung und Strukturaufklärung von "Y"

3.1 Vorkommen und chromatographisches Verhalten

Bei der chromatographischen Untersuchung von 2d41°C Proben trat in sehr geringen Mengen (ca. 2% des Gesamtpigments = ca. 5 µg/Kolben; Blank (1983)) ein grün gefärbtes Produkt auf, welches zunächst als "Y₁" bezeichnet wurde. In etwas größerer Menge (ca. 10 µg/Kolben) konnte dieses Produkt nach dreitägiger Inkubation bei 41°C beobachtet werden.

In der folgenden Abbildung ist die dunnschichtchromatographische Auftrennung wiedergegeben.

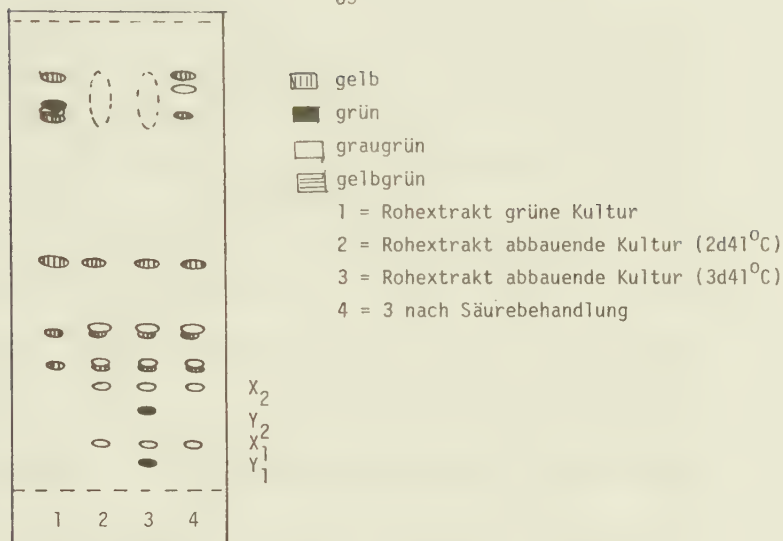


Abb.20 : Auftrennung von Extrakten aus grünen und abbauenden Zellkulturen(2d41°C, 3d41°C) und einem angesäuerten Extrakt (3d41°C/H⁺) (System 2)

Es stellt sich heraus, daß sogar noch ein weiterer Fleck im Chromatogramm erscheint mit $R_f = 0.3 (= Y_2)$. Weiter zeigt sich, daß Y_1 nach Säurebehandlung nicht mehr nachweisbar ist. Wahrscheinlich enthält Y_1 ein Zentralatom, das durch die Säurebehandlung entfernt wird. Da kein neuer Fleck nach Säurebehandlung auftritt, sollte das entmetallierte Pigment mit einem der bereits auf dem Chromatogramm vorhandenen Pigmente identisch sein.

3.2. Reinigung von Y_1

Aufgrund der Tatsache, daß Y_1 nur in sehr geringen Mengen auftritt, mußte Tabakzellkultur im Kg Maßstab angezogen werden. Dies konnte durch gleichzeitige Anzucht in jeweils etwa 10 Fernbachkolben mit je 300 ml Inhalt verwirklicht werden. Der Inhalt der Kolben konnte nicht erhöht werden, da bei zu großer Schichtdicke der Zellkultur die unteren Zellen zuwenig Licht und Sauerstoff erhalten, so daß kein gleichmäßiges Wachstum mehr möglich ist.

Nachdem der Rf-Wert, die Farbe und das chromatographische Verhalten darauf hinweisen, daß es sich bei Y_1 um ein metallhaltiges, unverestertes Chlorophyll Derivat handelt, wurde zur Anreicherung folgendes schonende Verfahren gewählt:

Durch Zweiphasenverteilung zwischen Petrolether und ammoniakalischem Methanol (vgl. II.6.3.1, Griffiths 1978) wurde der Rohextrakt der abbauenden (3d41°C) Proben zuerst in verestertes und unverestertes Pigment aufgetrennt. Die unveresterten Pigmente wurden dann weiter über eine Zuckersäule (vgl. II.6.3.2) aufgetrennt. Die dabei erhaltene Fraktion 5 (Abb. 4) wurde durch präp. HPLC (System 2) nachgereinigt. Das so gereinigte Y_1 zeigt Maxima in Ether bei 426 und 654 nm, ist also im Verhältnis zu Chl a ins kürzerwellige verschoben. (vgl. Abb. 23)

3.3. Derivatisierung von Y

Da Y ein Zentralatom enthält, wurde auf zwei verschiedenen Wegen methyliert:

3.3.1 Methylierung mit methanolischer Schwefelsäure

Bei der Behandlung mit Methylierungsgemisch sollte der entmetallierte Methylester entstehen ($Y_H + Me$). Y_f wurde nach II.3.5.1. mit Methylierungsgemisch methyliert und nach Neutralwaschen, Trocknen und Einengen bis zur spektroskopischen und chromatographischen Untersuchung bei $-18^\circ C$ unter Stickstoff aufbewahrt.

3.3.2. Methylierung mit Diazomethan

Bei der Behandlung mit Diazomethan sollte der metallhaltige Methylester (Y_{Me}) entstehen. Die Methylierung wurde nach II.3.5.2. durchgeführt.

3.3.3. Entmetallierung

Durch Behandlung mit konz. HCl wurde Y_f entmetalliert ($=Y_H +$) (vgl. II.3.4). Y_f ist schwerer zu entmetallisieren als Chl_a , die Reaktionszeit wurde deshalb auf 15 min verlängert.

3.4. Synthese von Vergleichssubstanzen

3.4.1. Synthese des Lactonderivats

Die kurzzeitige Verschiebung der Maxima ließ zuerst an eine lactonähnliche Struktur denken, von der dieses Phänomen bereits beschrieben war. Holt (1958)

beschreibt die Maxima von Mg-purpurin-7-lacton methylether-dimethylester (Abb. 21) in Ether bei 652 und 417 nm.

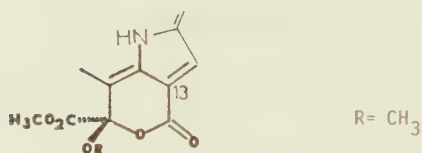


Abb. 21: Lactonstruktur

Das Lacton wurde nach Holt's Vorschrift durch Allomerisation hergestellt und die entsprechenden Methylester wurden chromatographisch und spektroskopisch miteinander verglichen. Das Chromatogramm (Abb. 22) und das Absorptionsspektrum (Abb. 24) zeigen, daß es sich bei Y₁ nicht um eine Lactonstruktur handeln kann.

3.4.2. Synthese von Zn-13²-Hydroxy-Methylpeid

Eine andere Möglichkeit, die kurzweilige Verschiebung zu erklären, ist der Ersatz von Mg durch ein anderes Metall als Zentralatom. Nachdem diese Möglichkeit erkannt war, erschien Zink von den Spektraldaten her am als geeignet (Somaya, 1962 ; Jones 1977). Zu Vergleichszwecken wurden deshalb Zn - 13²-Hydroxy

Methylpheid a sowie die beiden isomeren freien Säuren durch Metallierung (3.7.3) der metallfreien Hydroxyverbindungen synthetisiert.

3.5. Chromatographie der Derivate und Vergleichssubstanzen

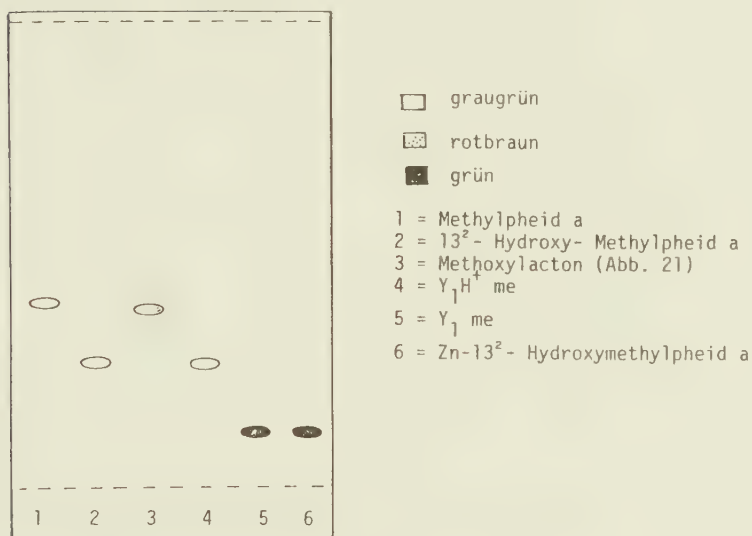


Abb. 22: Chromatographischer Vergleich der Methylester von Y_1 mit Syntheseprodukten (System 1)

Die chromatographische Auftrennung der Methylester zeigt, daß es sich bei Y_1 nicht um eine Verbindung mit Lactonstruktur handeln kann, tatsächlich haben Y_1me und Zn- 13^2 -Hydroxy Methylpheid a sowie Y_1H^+me und 13^2 -Hydroxy Methylpheid a den gleichen Rf-Wert. Dies zeigt, daß es sich bei Y_1 sehr wahrscheinlich um ein Hydroxy-Derivat von Chlorophyll a handelt.

3.6. Spektroskopische Untersuchungen von Y_1 und Derivaten

3.6.1. Absorptionsspektren der metallhaltigen Verbindungen

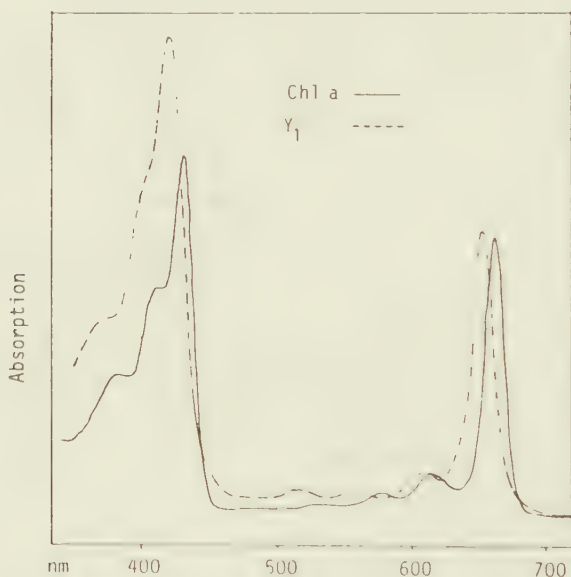


Abb. 23: Absorptionsspektrum von Y_1 und Chl a in Ether

Da der Grundkörper von Y_1 ein Hydroxy-Pheid a sein muß, wie die DC der Methylester zeigt, andererseits aber Y_1 im Vergleich zu Chl a kurzwellig verschobenen Maxima hat, muß Mg durch ein anderes Zentralatom ersetzt worden sein; ein hypothetisches 13^2 -Hydroxy Chlid a sollte das gleiche Absorptionsspektrum liefern wie Chl a, da der Chromophor jeweils derselbe ist.

3.6.2. Absorptionsspektren der metallfreien Verbindungen

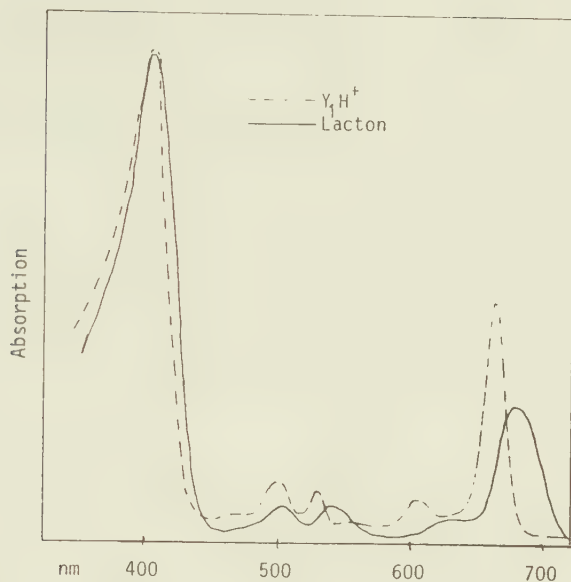


Abb. 24: Absorptionsspektren von Y_1H^+ , Lacton

Das Absorptionsspektrum von Y_1H^+ entspricht einem Phe a Spektrum. Von diesen Spektren unterscheidet sich das Spektrum des methylierten Lactons deutlich. Die Maxima bei 410 und 670 sowie die Form der langwelligeren Bande zeigen deutlich den Einfluß eines zusätzlichen Sauerstoffatoms im Ring E.

3.6.3. Fluoreszenzspektrum von Y_1

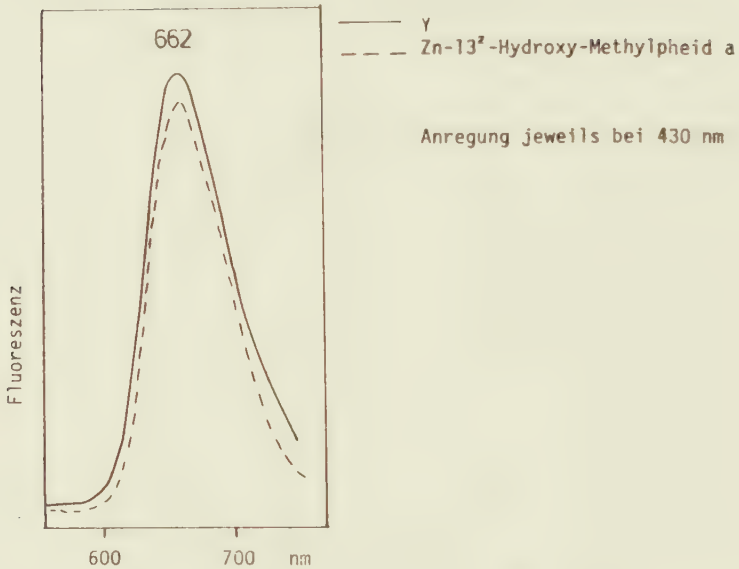


Abb. 25: Fluoreszenzspektrum von Y_1 und Zn-132-Hydroxy-Methylpheid a in Ether

Die Emissionsmaxima von Y_1 und Zn-132-Hydroxy-Methylpheid a liegen bei 662 nm. Im Vergleich zum Absorptionsmaximum ist damit die Emission um 6 nm ins längerwellige verschoben (Chl a: 7 nm). Das Excitationsmaximum beider Verbindungen im Kurzwelligen liegt bei 422 nm.

3.6.4. Massenspektren

Y_{me} und Zn-132-Hydroxy-Methylpheid a sind so wenig flüchtig, daß nur ein schwer interpretierbares Massenspektrum erhalten werden konnte. Auch mit FAB

Konnte kein Spektrum erhalten werden. Obwohl in der Literatur (Smith, 1975) eine Reihe von Massenspektren von Metallkomplexen beschrieben ist, scheint die Kombination von Zink und der zusätzlichen Hydroxy-Gruppe so polar zu sein, daß kein Massenspektrum erhalten werden kann. Auch andere Zinkverbindungen von Porphyrinen sind sehr schwer flüchtig (Strell, pers. Mitt.).

Bei Yme ist zwar beim erwarteten Molekulargewicht von 684 ein Peak zu sehen, das erwartete Isotopenmuster für Zink konnte jedoch nicht beobachtet werden.

3.6.5. Kernresonanzspektrum

In der folgenden Tabelle sind die chemischen Verschiebungen von γ_1 und ^{13}C -Hydroxy- Methylpheid a einander gegenübergestellt.

Tabelle 4: Chemische Verschiebungen von γ_1 und 13²-OH-Methylpheid a

Proton	γ_1	13 ² -Hydroxy- Methylpheid a
10	9.70	9.78
5	9.35	9.62
20	8.58	8.78
3 ¹	8.00	8.10
3 ²	6.32	6.36
3 ²	6.12	6.20
13 ²	-	-
13 ^{2'}	5.30	5.45
18	4.35	4.55
17	4.22	4.22
13 ⁴	3.65	3.70
12 ¹	3.60	3.60
17 ⁴	-	3.58
8 ¹	3.52	()
2 ¹	3.32	3.45
7 ¹	3.30	3.30
17 ¹ , 17 ²	2-3	2-3
18 ¹	1-2	1-2
8 ²	1-2	1-2

Die Daten sind in guter übereinstimmung, das Zentralatom hat offensichtlich nur sehr geringen Einfluß auf die chemische Verschiebung der einzelnen Protonen.

3.6.6. Atomabsorption

Da die Bestätigung, daß es sich beim Zentralatom um Zink handelt, durch Massenspektrometrie nicht eindeutig zu führen war, wurde eine Absicherung dieses bisher nur chromatographischen und spektroskopischen Befundes durch Atomabsorption angestrebt.

Dazu wurde eine Probe synthetisches Zn- 132 -Hydroxy-Methylpheid a mit bekannter Extinktion mit einer Probe γ_{me} mit ebenfalls bekannter Extinktion verglichen. Falls es sich beim Zentralatom um Zn handelt, so sollten die durch Atomabsorption ermittelten Zn-Werte im gleichen Verhältnis stehen wie die Extinktionen.

	Ext. 426 nm	Zn (aus AAS)
γ_{me}	0.810	0.49 μ g
Zn 132 -OH MPheid	2.261	1.40 μ g

Die Extinktionen stehen im Verhältnis 1:2.79, die Zinkwerte im Verhältnis 1:2.83.

Durch diese Messungen konnte eindeutig bestätigt werden, daß es sich beim Zentralatom von γ_1 um Zink handelt. Damit steht die Struktur von γ_1 als Zn- 132 -Hydroxy- Pheid a fest.

3.6.7. CD-Spektroskopie

Durch Metallierung der Hydrolyseprodukte von 132 -Hydroxy-Methylpheid a können die beiden isomeren Hydroxysäuren als Zinkderivat erhalten werden. Beide sind im Rohextrakt aus Tabakzellkulturen enthalten. Zur

Aufklärung der absoluten Konfiguration wurden CD-Spektren der getrennten Verbindungen aufgenommen. Durch Vergleich mit den für die isomeren 13² Hydroxy-Pheide ermittelten Spektren (vgl. Abb. 19) zeigt sich, daß das bisher als Y₁ bezeichnete Produkt die 13²(S) Konfiguration besitzt (Vgl. III.2.9)

Die Intensität der Signale bei 430 und 550 nm ist beim Produkt mit der 13²-(S)- Konfiguration deutlich niedriger. Wie bei den metallfreien Derivaten ist eine Aufspaltung im kurzwelligen Maximum erkennbar. Das Vorzeichen der Bande bei 280 nm ist beim 13²-(R)-Derivat negativ.

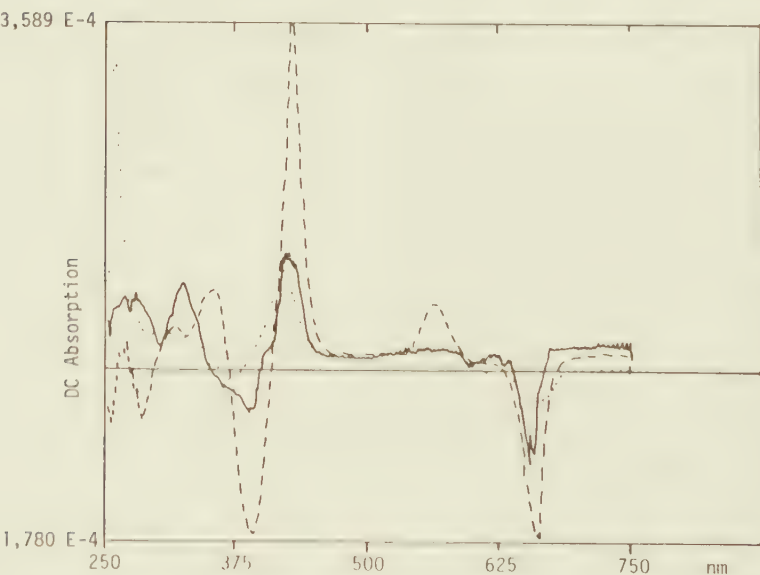


Abb. 26: CD Spektren von Y₁ (.....) ,
Zn-13²-(R)-(- - - -) und
Zn-13²-(S)-Hydroxy-Pheid a (——)

3.7. Chromatographische Untersuchung der freien Säuren

Durch Entmetallierung von Y_1 und Y_2 und Cochromatographie mit den isomeren 13^2 -Hydroxy-Pheiden kann gezeigt werden, daß es sich bei Y_1 um das Zn- 13^2 -(S)- und bei Y_2 um das Zn- 13^2 -(R)-Hydroxypheid a handelt (Abb.27). Somit kann die Struktur aller in abbauenden Tabakzellkulturen vorkommenden Chlorophyll a Derivate angegeben werden. Die folgende Übersicht stellt alle Pigmente nebeneinander:

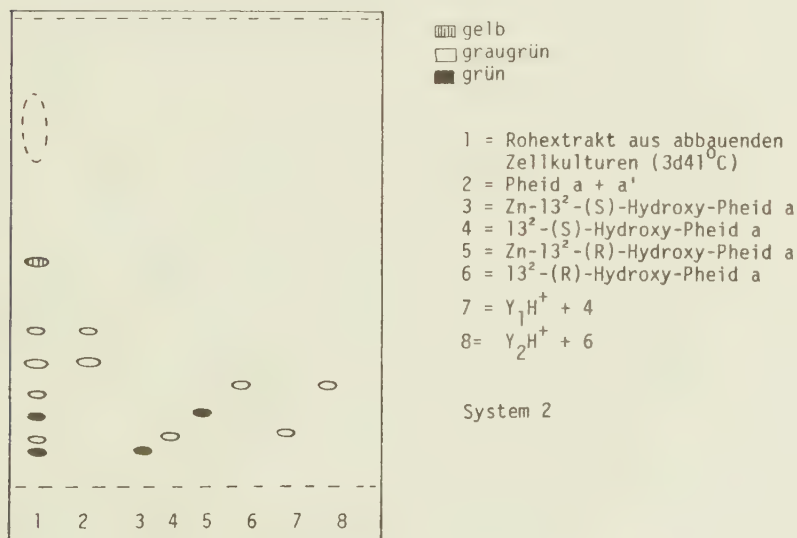


Abb. 27: Übersichtschromatogramm

3.8. Diskussion

Durch Chromatographie, Spektralanalyse und Atomabsorption konnten in seneszierenden Tabakzellkulturen Zn- 132 (R)- und Zn- 132 (S)-Hydroxy- pheophorbid a und a' nachgewiesen werden. Obwohl die Metallierung eine Reaktion ist, die chemisch unter geeigneten Bedingungen ohne weiteres abläuft, ist doch noch nie von einem Fall berichtet worden, wo diese Reaktion in einem wässrigen System abläuft. Auch die 132 -Hydroxylierung tritt chemisch leicht ein, vor allem bei Methanolbehandlung (Svec 1978) wie bei der Zweiphasenverteilung. Y_1 und Y_2 sind jedoch bereits im Rohextrakt von gealterten Kulturen enthalten. Da sie in Extrakten aus frischen Zellkulturen nicht auftreten, können sie nicht durch die Aufarbeitung entstanden sein. Die Tatsache, daß in Zellkulturen, welche vor der Dunkelinkubation gekocht wurden, weder Hydroxy- noch Metallderivate gefunden werden (Zimmer 1984) scheint auf eine enzymatische Reaktion hinzuweisen. Warum ausgerechnet Zink unter allen anderen Metallen bevorzugt wird (u.a. sind Mn, Ni, Mg im Medium enthalten) kann aus den vorhandenen Daten nicht beurteilt werden.

4. Das Pigment "Z"

4.1. Vorkommen und Reinigung

Lüthy et al. 1984 berichten über eine Chlorophylloxidase Reaktion, bei welcher endogenes Chlorophyll aus Gerstenthylakoiden in Gegenwart von Linolensäure ausgebleicht wird. Diese Reaktion läuft innerhalb 2-10 min ab und ist durch Erhitzen auf 100°C vor Inkubation vollständig blockierbar. Die Reaktion wurde üblicherweise durch Aceton gestoppt. Schoch et al. (1984) haben als erstes Reaktionsprodukt 13²-Hydroxy-Chl a identifiziert.

Läßt man jedoch die Reaktion weiterlaufen (z.B. über Nacht), so tritt ein weiteres Produkt auf (= "Z"). Das gleiche Bild der Pigmente (Hydroxy-Chl a und Z) ergibt sich ebenfalls, wenn man gekochte Thylakoide über Nacht stehen läßt (Schoch, pers. Mitt.). Setzt man gereinigtes Chlorophyll a den gleichen Bedingungen aus wie die Thylakoide in der geschilderten Reaktion, so treten nach 12 h die gleichen Produkte auch in diesem völlig synthetischen Ansatz auf. 13²-Hydroxy-Chl a wurde als Reaktionsprodukt bereits identifiziert (Schoch ,pers. Mitt.) Mit der Strukturauklärung des zweiten Produkts, kurz als "Z" bezeichnet, beschäftigt sich der dritte Teil dieser Arbeit.

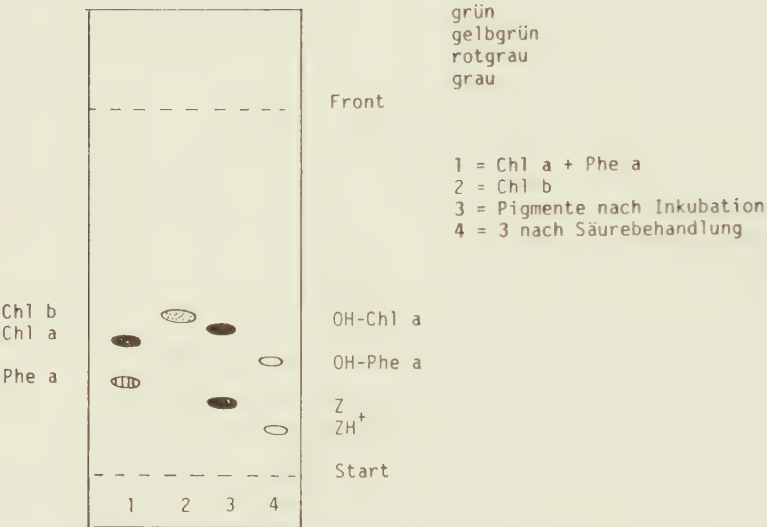


Abb. 28: DC : Auftrennung der Pigmente nach Inkubation
in Puffer/Linolensäure (System 4)

Zur Abtrennung von Triton X 100 und Linolensäure, welche beide eine spätere chromatographische Reinigung erschweren, wurde zunächst eine Dioxanfällung durchgeführt (siehe II. 7.2). Dabei ist zwar mit größeren Verlusten von "Z" im Vergleich zu Hydroxy- Chl a zu rechnen; dieser Faktor fällt hier aber kaum ins Gewicht, da Chl a als Ausgangssubstanz in jeder gewünschten Menge hergestellt werden kann.

Die weitere Reinigung erfolgte über eine Zuckersäule, entwickelt wurde mit Petrolether: n-Propanol 99.5 : 0.5. Z wird dabei als erste Zone eluiert (vgl. II. 3.2). Durch eine weitere Reinigung über HPLC (System 2) kann ein reines Produkt gewonnen werden.

4.2. Derivatisierung von "Z"

Wie in Abb. 28 gezeigt, läßt sich Z durch Salzsäure entmetallisieren. Da als Ausgangsprodukt authentisches Chl a eingesetzt wurde, kann es sich beim Zentralatom nur um Magnesium handeln. Von den Absorptionsspektren abgesehen wurden alle anderen Arbeiten mit diesem Produkt aus Gründen der größeren Stabilität mit dem metallfreien Derivat (= "ZH+") durchgeführt.

4.2.1. Entmetallierung

Die Reaktionsprodukte des synthetischen Ansatzes (Chl a, Linolensäure, Puffer vgl.II.7.1.) wurden nach überführen in Ether (II.7.2) insgesamt durch HCl entmetalliert und die entstandenen Pheophytine über präparative DC gereinigt (System 1)

4.2.2. Methylierung

Der gereinigte Phytylester ("ZH+") wurde nach 3.5.1. mit Methylierungsgemisch versetzt und am Rückfluß erhitzt. Da bei der üblichen Methode (30 min) eine Reihe von Nebenprodukten zu beobachten war, mußte schonender methyliert werden. Die Reaktionszeit wurde deshalb auf 15 min begrenzt. Der entstandene Methylester ("Zme") wurde durch präparative Schichtchromatographie (System1) gereinigt. Das chromatographische Verhalten von ZH+ und Zme ist in der folgenden Abb. wiedergegeben.

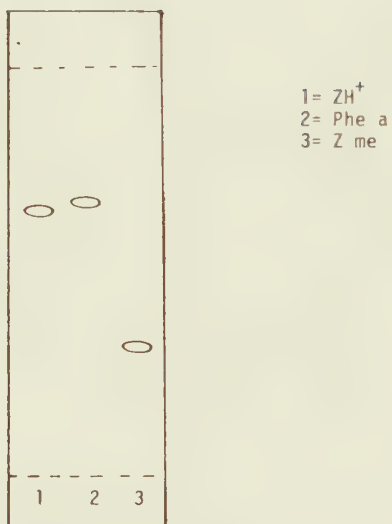


Abb. 29: DC von ZH^+ und Zme (System 1)

4.3. Spektroskopische Untersuchungen

4.3.1. Absorptionsspektren

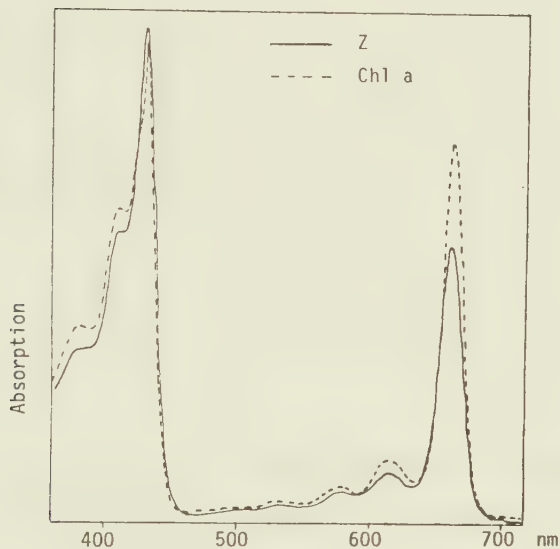


Abb. 30: Absorptionsspektren von Z und Chl a in Ether

Im Vergleich zu Chl a besteht kein Unterschied in der Lage der Absorptionsmaxima (jeweils 430 und 662 nm). Das Verhältnis von Soretbande zum "roten" Maximum beträgt bei Z 1.79, bei Chl a 1.32.

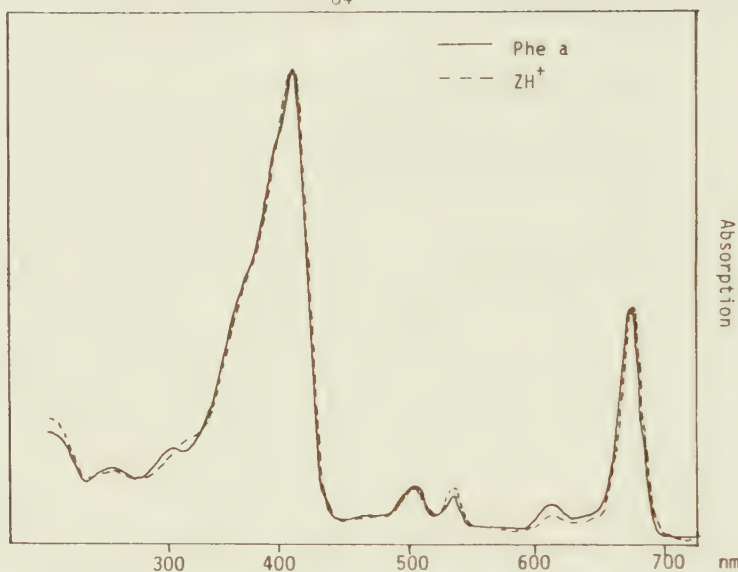


Abb. 31: Absorptionsspektren von ZH⁺ und Phe a in Ether

Bei den entmetallierten Verbindungen ergeben sich deutliche Unterschiede im spektroskopischen Verhalten. Das langwellige Maximum von Z ist im Vergleich zu Phe a um 3 nm auf 670 nm verschoben. Das Verhältnis Soretbande/rotes Maximum liegt bei 2.42 (Phe a: 1.99). Außerdem ist die Bande bei 535 nm im Verhältnis zur Absorption bei 505 nm bei Z geringfügig erhöht (505:535 = 1.05, Phe a: 1.19).

Bei 13²-Hydroxy-, 20 Cl Methylpheid a ist dieser Effekt noch deutlicher ausgeprägt. Die Bande bei 535 nm ist dort höher als die Absorption bei 505 nm (Scheer et al. 1984).

4.3.2. Massenspektrometrie

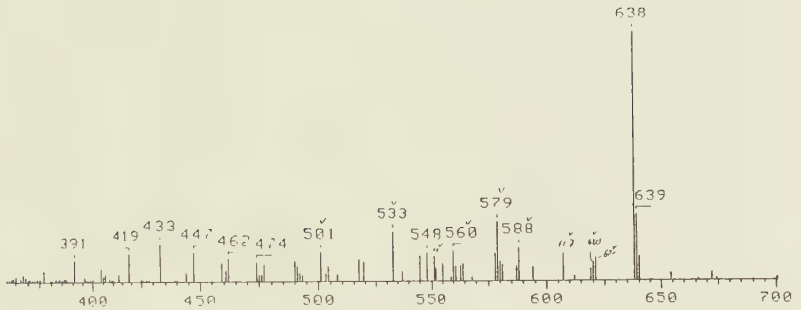


Abb. 32: MS von Zme

Die relativen Intensitäten der m/e Werte im Vergleich zu 13²-Hydroxy-Mpheid a und Methylpheid a sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 5: Intensitäten der Abspaltungen

M-	Methylpheid a	13 ² -OH-MPheid a	Zme
17	-	-	9
18	-	-	7.8
31	-	-	11.7
32	3.3	-	14.3
59	15.2	64.5	23.4
78	-	-	11.7
87	7.3	37.0	10.4
118	-	39.9	-
147	25.2	21.0	-
164	-	-	7.8

Im Vergleich zu Methylpeid a und Hydroxy-Methylpeid a treten einige zusätzliche Abspaltungen auf: M-17 bzw. M-18 und M-31 sind ein Hinweis auf die Abspaltung von Sauerstoffhaltigen Bruchstücken. Die für Methylpheophorbide charakteristischen Fragmentierungen M-59 und M-87 sind zu 23.4 bzw. 10.4% vorhanden. M-147, sonst ein typisches Signal für Methylpheide, fehlt, dafür tritt M-164 (M-147 -17) mit 7.8% Intensität auf.

4.3.3. Kernresonanzspektrum

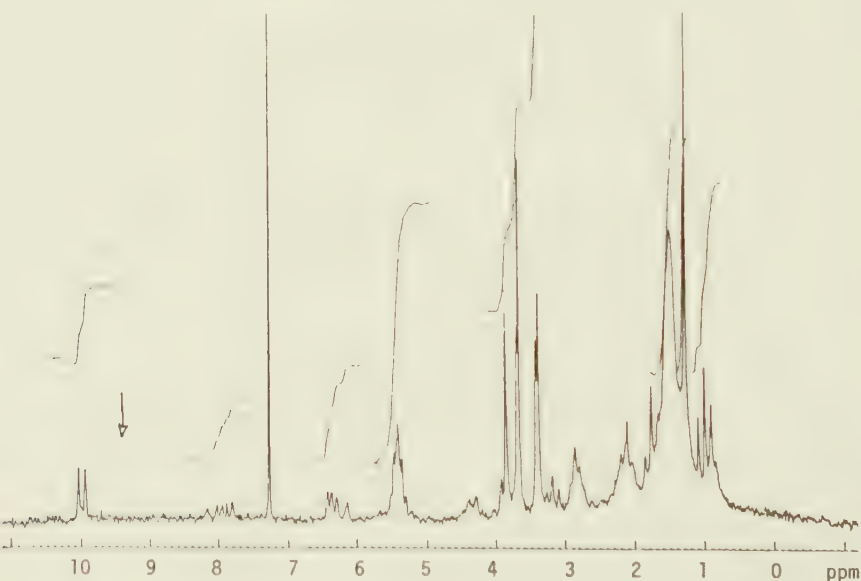


Abb. 33: NMR von Zme, Zur Zuordnung der Signale vgl. Abb.14

Im ^1H -NMR ist der auffälligste Unterschied zu Chl a, Methylpeid a und Hydroxy-Methylpeid a das Fehlen des 20-Prottons im Methinbereich bei 9-10 ppm. Das

Vinylsystem an C-3 ist intakt wie die Signale bei 7.90 und 6.30 ppm zeigen. Die Anzahl der Methylgruppen und die Ethylgruppe an C-8 ist unverändert im Vergleich zu Methylpheid a.

4.3.4. CD-Spektrum

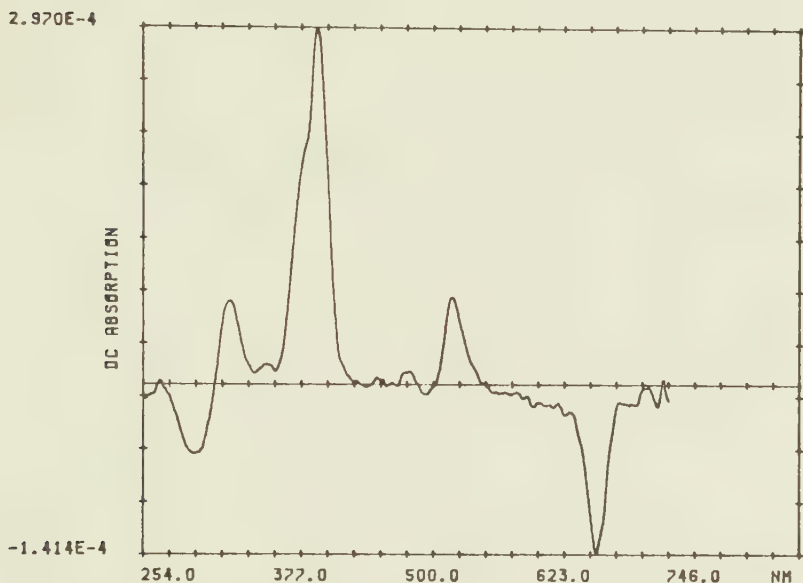


Abb. 34: CD-Spektrum von ZH⁺

Im Vergleich zu den CD Spektren von 13²-Hydroxy-Pheid a und Zn 13²-Hydroxy-Pheid a tritt als deutlichster Unterschied vor allem die wenig ausgeprägte Bande bei 280 nm auf. Es könnte jedoch gezeigt werden, daß ein Isomerengemisch von 13²(S) und 13²(R) Hydroxy-Pheid a ein nahezu identisches CD Spektrum aufweist. Deswegen ist es naheliegend, daß es sich bei ZH⁺ ebenfalls um ein Isomerengemisch

handelt. Bereits das als Ausgangsmaterial verwendete Chl a liegt durch die Aufarbeitung als Isomerengemisch vor (Hynninen 1981 a).

4.3.5. Fluoreszenzspektrum

In Abb. 35 sind die Fluoreszenzspektren von Z und Zme wiedergegeben.

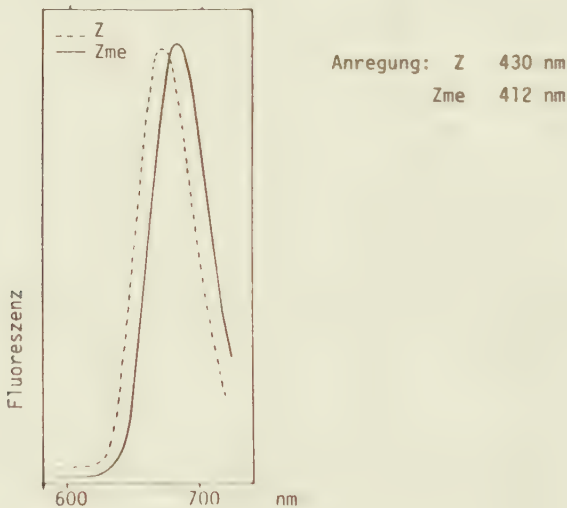


Abb. 35: Fluoreszenzspektren von Z,Zme

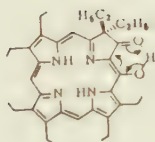
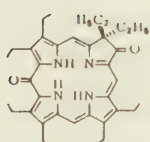
Z zeigt ein Fluoreszenz- Emissionsmaximum bei 670 nm (Chl a : 669 nm). Im Vergleich zum Absorptionsmaximum besteht hier eine Rotverschiebung von 8 nm (Chl a: 7 nm). Zme hat ein Emissionsmaximum bei 682 nm (Phe a : 680 nm).

4.4. Diskussion

Das NMR-Spektrum zeigt, daß die 20-Position substituiert ist. Das π -Elektronensystem ist im Vergleich zum Chl a nahezu unverändert, wie das Absorptionsspektrum zeigt (Abb. 30). Durch das Fehlen des Signals bei 6,22 ppm ist auch die Abwesenheit des C-13²-Protons belegt. Das Austauschexperiment mit D₂O zeigt die Anwesenheit eines aziden Protons bei 5.37 ppm ähnlich wie bei 13²-Hydroxy- Methylpheid a. Aus dem NMR ist weiter zu entnehmen, daß die anderen Positionen im Molekül unverändert sind. Es handelt sich also bei Z um ein 13²,20 disubstituiertes Phorbin. Das Molekulargewicht von ZH⁺ ist 638, also um 32 Einheiten größer als bei Methylpheid a bzw. 16 Einheiten größer als bei 13²-Hydroxy- Methylpheid a. Im Massenspektrum ist M-17 mit 9% vertreten, ein deutlicher Hinweis auf ein zusätzliches Sauerstoffatom.

Bei 13²-Hydroxy- Methylpheid a tritt diese Abspaltung nicht auf. Aus den vorliegenden Daten muß also gefolgert werden, daß es sich bei Z um ein 13²,20 Dihydroxy-Chl a handelt, obwohl das 20 -Hydroxy-Proton im NMR nicht nachweisbar ist.

Aufgrund der Arbeit von Gossauer und Inhoffen könnte außerdem erwartet werden, daß sich bei einer Hydroxy-Substitution an einer Methinbrücke eine Oxyphlorinstruktur ausbildet. Laut bisherigen Literaturberichten (Inhoffen 1969) bleibt das aromatische System nur erhalten, wenn die Hydroxy-Gruppe stabilisiert ist wie z.B. bei (1)



(1)

Abb. 36: Oxyphlorinstruktur und Stabilisierung der meso-Hydroxy Struktur

Obwohl bei 2 keine derartige Stabilisierung erkennbar ist, wird nach dem Absorptionsspektrum zu urteilen, hier das aromatische System bevorzugt. Das Laufverhalten bei der DC ist zunächst unerwartet, da eine Dihydroxyverbindung noch polarer sein sollte, als 13²-Hydroxy-Methylpheid, im System 1 also folgende Reihenfolge der R_f-Werte erwartet wird: Methylpheid, 13²-Hydroxy-Methylpheid > Zme. In Analogie zu dem Befund bei 2 steht jedoch, daß zum Beispiel 13²-Hydroxy-,20-Cl-Methylpheid a ein ähnliches Laufverhalten zeigt (H.Scheer, in Vorbereitung).

Dies ist das erste Mal, daß im Zusammenhang mit dem Chlorophyllabbau von einem 20-substituierten Phorbin berichtet wird.

Hynninen (1981) berichtet, daß eine 20 Cl-Substitution an Chl a bereits durch die geringe Chlor-Konzentration im Leitungswasser verursacht werden kann. Die 20-Position ist also offensichtlich elektrophil leicht angreifbar.

Zusammenfassend läßt sich über alle drei identifizierten Produkte folgendes aussagen:

Der entscheidende Schritt, an dem viele frühere Untersuchungen über Chlorophyllabbauprodukte scheiterten, ist die Anreicherung von Zwischenprodukten des Abbaus. Dies gelang durch Dunkelinkubation von Tabakzellkulturen, gestützt auf die Vorarbeiten von Vielwerth (1982) und Blank (1983). Durch die ausgereifte Mikroanalytik - hinzuweisen ist hier vor allem auf die Möglichkeit, NMR Spektren im Konzentrationsbereich von 10^{-8}M zu messen - konnte auch das Problem der geringen Substanzmenge gelöst werden.

Obwohl Hydroxy- Derivate von Chl a leicht durch chemische Einflüsse während der Aufarbeitung entstehen können, ist dies durch die geeignet Arbeitstechnik zu verhindern (niedrige Temperatur, ständige Stickstoffbegasung). Bei der Darstellung von Methylphoid a aus Chl a, welches aus Spinat oder Spirulina extrahiert wurde, waren keine Hydroxyderivate nachweisbar.

Die Hypothese, daß die Hydroxylierung einen wichtigen Schritt beim Chlorophyllabbau darstellt, wird auch durch die Arbeit von Maunders et al. (1983) unterstützt, in der über ein Hydroxy- Chl a in abbauenden Gerste- und Bohnenprimärblättern berichtet wird.

Der Befund, daß es sich bei Z ebenfalls um ein Hydroxyderivat handelt, deutet in die gleiche Richtung. Die Bedingungen, unter denen Z synthetisiert wurde (pH

6.8, Linolensäure, Chl a) könnten auch in abbauenden Chloroplasten verwirklicht sein.

5. Enzymatische Untersuchungen an Tabakzellkulturen

5.1. Pigmentvergleich nach Inkubation der Homogenate

Bei grünen und abbauenden (bei 27°C im Dunkeln) Tabakzellkulturen wurden unterschiedliche *in vivo* Spektren beobachtet (Blank 1983, Schoch et al. 1984). Während die Maxima von grünen Zellen bei 437 und 680 nm liegen, zeigen seneszierende Zellen Maxima bei 414, 684 und 545 nm. Dies ist ein Hinweis darauf, daß *in vivo* eine Pheophytinisierung stattgefunden hat.

Untersucht wurde die Fähigkeit von Zellhomogenaten aus grünen und verschieden lange dunkel gestellten Tabakkulturen, Chlorophyll zu verändern. Von Interesse war, ob sich die prozentuale Zusammensetzung Chl : Phe : Pheid und / oder die Gesamtpigmentmenge während der Inkubation ändert.

Dazu wurden bei verschiedenen Temperaturen (0,33°C) Zellhomogenate aus grünen und abbauenden Tabakzellkulturen je zwei Stunden im Dunkeln (um Photooxidationen auszuschließen) inkubiert. Nach Inkubation werden die Proben extrahiert und Absorptionsspektren aufgenommen. Da sich aus den Absorptionsspektren keine Unterschiede erkennen ließen, wurden die Proben eingeeengt, mittels DC aufgetrennt und densitometrisch ausgemessen.

In Tabelle 6 sind jeweils Chl (a+b), Phe (a+b) und Pheid (a+b) einander gegenübergestellt. Angegeben sind

jeweils die % vom Gesamtpigment.

Vor Beginn des Versuchs wurden jeweils *in vivo* Spektren gemessen, um eine mögliche hypsochrome oder bathochrome Verschiebung bereits vor Zerkleinerung der Zellen zu dokumentieren. (Abb. 37)

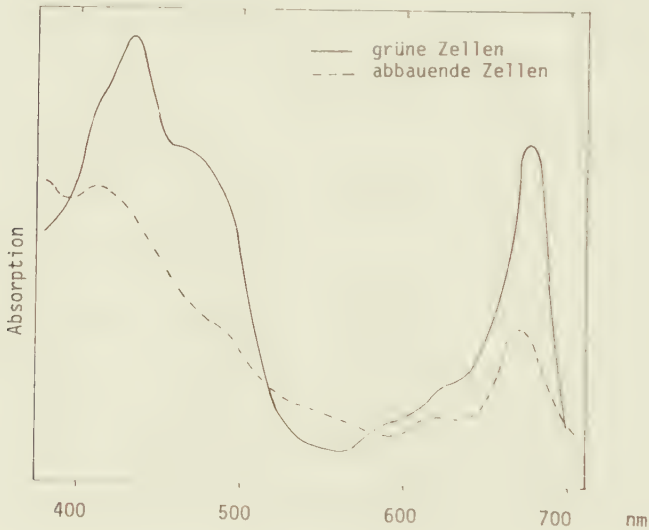


Abb. 37: *in vivo* Spektren grüner und abbauender Zellen
vor Zerkleinerung

In Abb. 38 sind die entsprechenden Etherspektren wiedergegeben.



Abb. 38 : Spektren des Etherextrakts von grünen (———) und abbauenden (7 Tage bei 27°C im Dunkeln) Tabakzellkulturen (- - - -)

Tabelle 6: Ergebnisse der densitometrischen Auswertung

nr.	Phe (a+b)	Chl (a+b)	Phe:rd (a+b)	dk	M	Ext	Ko	U/N
	18.6	75.9	5.5	-	430	-		U
	14.0	81.0	5.0		430	-	+	N
	24.6	72.8	2.7		430	-	-	N
	28.8	47.5	23.7	20	410	-		U
	35.4	37.7	26.9		410	-	+	N
	28.3	42.1	29.5		410	-	-	N
	20.6	73.4	6.0	-	430	0.335		U
	20.3	70.1	9.5		430	0.272	+	N
	17.3	76.2	6.4		430	0.310	-	N
	29.3	29.0	41.7	18	410	0.674		U
	27.5	27.5	44.9		410	0.660	+	N
	27.8	25.1	47.0		410	0.640	-	N

U/N = vor bzw. nach Inkubation bei 33°C

Ko. = Die Probe wurde vor Inkubation gekocht

M = Kurzwelliges Absorptionsmaximum

Ext = Extinktion im roten Maximum

dk = Tage Dunkelinkubation bei 27°C

Auch die Daten von 2,5,7 und 11 Tage dunkel gestellten Zellen zeigen ein ähnliches Bild: kein auffälliger Unterschied in den Werten vor und nach Inkubation.

Die Verlängerung der Inkubationszeiten auf drei bzw. 18 Stunden erbrachte ebenfalls keine Unterschiede.

Die Daten zeigen folgendes:

1. Die Gesamtpigmentmenge und das Verhältnis der Pigmente untereinander verändern sich während der Versuchsdauer nicht, die Extinktionsdifferenzen vor und nach Inkubation sind so gering, daß sie als innerhalb des systematischen Fehlers liegend betrachtet werden müssen. Es ist beispielsweise nicht möglich, Pellets von seneszierenden Zellkulturen nach Extraktion ebenso farblos zu erhalten, wie dies bei grünen Zellen der Fall ist.

2. Die densitometrische Auswertung der DC Platten ist - verglichen mit einer HPLC Trennung - mit relativ großen Fehlern behaftet. Es ist unwahrscheinlich, daß in grünen Zellkulturen bereits 5% Pheid (Vgl. Versuch Nr. 1 in Tabelle 6) enthalten sind. HPLC-Chromatogramme von grünen Zellen haben immer nur verestertes Pigment angezeigt.

Eine Fehlerquelle liegt auch darin, daß bei der densitometrischen Auswertung ein Filter mit 663 nm verwendet wurde; es wird also nicht bei allen Pigmenten im Absorptionsmaximum detektiert. Chla und b sowie deren Derivate werden dadurch unterschiedlich stark erfaßt.

Der große Vorteil der densitometrischen Auswertung liegt darin, daß wesentlich mehr Proben pro Zeiteinheit untersucht werden können, als dies durch HPLC möglich

wäre. In der Kombination mit einer spektroskopischen Untersuchung, wie dies hier geschehen ist, ist die Methode für Reihenuntersuchungen geeignet.

5.2. Versuche zum Nachweis der Lipoxygenase

Holden (1965) , Zimmermann und Vick (1973), Sakai-Imamura (1975) und Imamura und Shimizu (1974) berichten über ein System, welches in der Lage ist, Chlorophyll in vitro in Gegenwart von Linol- bzw. Linolensäure zu farblosen Produkten abzubauen. Holden bezeichnete diesen Effekt als "Chlorophyll-Bleaching". Imamura und Shimizu haben verschiedene Pflanzenextrakte (Karoffeln, Weizen, Mais) auf dieses Phanomen getestet. In dieser Arbeit wurde versucht, diese Experimente mit Tabakzellkulturen nachzuvollziehen (auch Hafer und Weizenkeimlinge dienten als Versuchsobjekte). Die Gewinnung der Pflanzenextrakte ist in II.8.2. beschrieben.

Der ursprüngliche Reaktionsansatz war folgender:

Chl a	50 μ l	(3.0×10^{-4} M)
Linolsäure	50 μ l	(2.7×10^{-2} M)
Phosphatpuffer	3 ml	(0.05 M, pH 6.8, 0.2% Triton)

Extrakt 50 μ l

Das Gesamtvolumen betrug 3.15 ml, das molare Verhältnis von Linolsäure: Chl a 90:1.

Puffer, Linolsäure und Chl a wurden zusammenpipettiert, der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 μ l Extrakt. Die Reaktion wurde anhand der

Extinktionsänderung bei 668 nm (Absorptionsmaximum von Chl a unter diesen Bedingungen) verfolgt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den folgenden Diagrammen dargestellt:

39 a

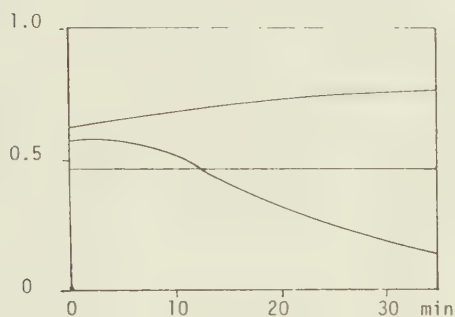
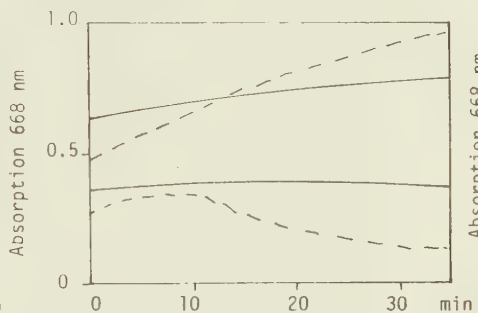


Abb. 39 a: Proben ohne Extrakt

39 b



39 b: Proben mit Extrakt

— Extrakte aus Tabakzellkultur
--- Extrakte aus Weizen

Beobachtungen und Schlußfolgerungen:

1. Das Problem des Nullwerts

Besondere Schwierigkeiten der Interpretation bereitete die Beobachtung, daß beim Nullwert die Extinktion manchmal anstieg, manchmal abnahm und manchmal gleichblieb. Nachdem zunächst die gleichbleibende Extinktion als normaler Nullwert angesehen wurde, das Ansteigen als Folge von Trübungerscheinungen in der Küvette durch

ein Zusammenwirken von Linolsäure- und Tritonkonzentration gewertet wurde, blieb die Extinktionsabnahme zunächst unverständlich.

2. Obwohl jeweils die gleiche Menge Chl a eingesetzt wurde, sind die Anfangsextinktionen sehr unterschiedlich. Hier wurde so vorgegangen, daß die zuvor berechnete Menge Chl a in Ether aufgenommen wurde, darauf Puffer zugegeben wurde, und gerührt wurde bis sich Chl a gelöst hatte. Bei dieser Methode blieb immer etwas Chl a an der Gefäßwand haften. Das Problem, die sehr lipophile Substanz Chl a in die wässrige Phase zu bringen, konnte jedoch später (vgl. II.7.1) gelöst werden.

3. Es konnte kein Unterschied zwischen gekochten und ungekochten Extrakten beobachtet werden.

Diese Beobachtungen blieben zunächst unverständlich. Erst im Zusammenhang mit den Untersuchungen über Z, wo ja der Reaktionsansatz sehr ähnlich ist, konnten die Beobachtungen angemessen interpretiert werden.

Bei einem rein synthetischen Ansatz zur Gewinnung von Z (Puffer, Chl a, Linolen säure) tritt ebenfalls ein Chlorophyll-Bleaching auf (Schoch, pers. Mitt.). Dies tritt jedoch nicht sofort ein, sondern die Extinktion bleibt ca. 45-150 min konstant, dann erst setzt die Abnahme ein. Die Beobachtung, der Abnahme bzw. des Gleichbleibens der Extinktion hängt also vom Zeitpunkt der Messung nach Linolsäurezugabe ab, nicht von der Extraktzugabe.

Nachdem dies bekannt war, wurde nochmals der Ansatz der Lipoxxygenase-Reaktion gemacht (Puffer, Chl a, Linolsäure) nur daß diesmal kein Extrakt zugesetzt wurde (vgl. Abb. 39 a).

Tatsächlich geschieht hier das gleiche wie bei der Reaktion zu Z. Die Reaktionsprodukte wurden extrahiert und erwiesen sich als chromatographisch identisch mit 13²-OH Chl a und Z.

Das Problem des Nullwerts ergibt sich also nur dann, wenn die Lösungen einige Zeit vor Gebrauch hergestellt werden. Das gleiche gilt natürlich auch für die Versuche mit den Extrakten. Tatsächlich hat also nach diesen Beobachtungen der Extrakt keinen Einfluß auf das Chlorophyll-Bleaching!

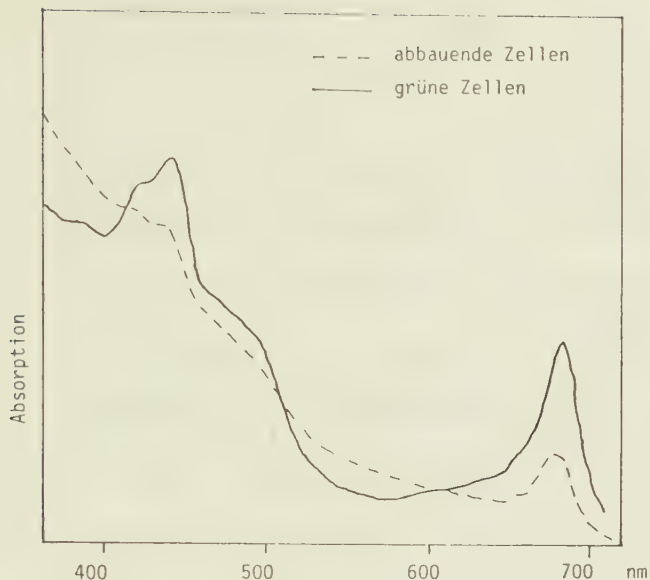
Im Verlauf des Ausbleichens von Chlorophyll sollte ein Abbau zu farblosen Produkten stattfinden, da sowohl Z als auch OH-Chl a ähnliche Extinktionskoeffizienten haben sollten wie Chl a, da ja der Chromophor der gleiche ist.

5.3. Versuche zum Nachweis der Mg-Dechelatase

Während der Durchführung der Homogenatversuche erschien eine Arbeit von Owens und Falkowski (1982), in der über einen enzymatischen Abbau von Chl a und Chl_{id} a zu Phe a und Phe_{id} a in Diatomeen berichtet wird. Der Abbau wird dort durch ein "Magnesium Releasing enzyme" und Chlase verursacht; beide Systeme werden durch Homogenisierung aktiviert. Es zeigt sich ein Unterschied in der Aktivität von Spezies zu Spezies. Verfolgt werden kann diese Reaktion durch Spektroskopie (Messung alle 20 min). Dabei tritt eine Rotverschiebung des langwelligen Maximums auf, verbunden mit einer Blauverschiebung des kurzwelligen Maximums und dem Erscheinen eines neuen Peaks bei 540 nm. Diese Daten sind für ein *in vivo* Spektrum von Pheophytin charakteristisch.

Auch Ziegler et al. (1982 a,b) berichten von einer Mg-Dechelatase in Chlorella und Gerste, welche spezifisch auf unverestertes Chl_{id} a ist.

Es wurde versucht, diese Beobachtung an grünen und verschieden lange dunkel gehaltenen Tabakzellkulturen nachzuvollziehen. Bei einem Teil der Versuche wurde 1% Triton X-100 zugesetzt, um eine möglicherweise bessere Exposition des Pigment zu erreichen. Verglichen wurden grüne und 12 Tage dunkel gestellte Tabakproben (27°C).



Während jeweils dreistündiger Messung kann keine Veränderung des Spektrums beobachtet werden.

Abb. 40: Spektren des Zellhomogenats (alle 30 min)
von grünen und abbauenden Tabakzellen

Bei beiden Proben zeigte sich innerhalb 3 Std. bei jeweils 30-minütiger Messung keine Peakverschiebung und keine Extinktionsabnahme. Der Zusatz von 1% Triton X-100 bewirkte keine Veränderung. Unter den geschilderten Bedingungen ist also weder eine Mg-freisetzende noch eine "bleaching"-Aktivität nachweisbar. Entweder existiert ein solches Enzym in Tabakzellkulturen nicht, oder es ist unter diesen Bedingungen nicht aktiv.

5.4. Diskussion

In grünen und abbauenden Tabakzellkulturen konnte weder ein Zusammenhang des Chlorophyllausbleichens mit

der Lipoxxygenase-Aktivität noch eine Mg-freisetzende Aktivität nachgewiesen werden. Der von verschiedenen Autoren (Holden 1965, Sakai-Imamura 1975) vorgeschlagene Zusammenhang zwischen der Lipoxxygenaseaktivität und dem Chlorophyllabbau muß nach den vorliegenden Ergebnissen bezweifelt werden, da tatsächlich ein Ausbleichen des Chlorophylls und die Entstehung von Abbauprodukten auch in völlig synthetischen Ansätzen ohne jede Beteiligung von Pflanzenextrakten beobachtet werden kann. Das Eintreten dieser Reaktion ist vom Zeitpunkt der Zugabe von Linol- bzw. Linolensäure zu einer Chl a Lösung abhängig.

Auch die von Lüthy et al. (1984) beschriebene Chlorophyll-Oxidase Reaktion erscheint hier unter einem neuen Blickwinkel. Zwar konnte dort das Auftreten der Oxidase-Reaktion durch Erhitzen der Thylakoide auf 100° vor Inkubation verhindert werden, jedoch nur für relativ kurze Zeit. Im Zusammenhang mit durch Substraten für Lipoxydase und Oxidasen ausgelöste Reaktionen sind also mindestens zwei Reaktionen voneinander zu unterscheiden:

- a) eine Reaktion, die durch Zugabe von Pflanzenextrakten ausgelöst werden kann und
- b) eine Reaktion, die unabhängig von Pflanzenextrakten abläuft.

Auch ein von Owens (1982) vorgeschlagene "Mg releasing enzyme" konnte weder in grünen noch in abbauenden TK nachgewiesen werden. Da aber selbst bei den Untersuchungen von Owens große Unterschiede von Spezies zu Spezies auftraten, scheint es sich nicht um ein

weit verbreitetes Enzym des Chlorophyll Abbaus zu handeln.

Da aber andererseits einige Abbauprodukte des Chlorophylls bekannt sind, von denen eine nichtenzymatische Entstehung nur schwer vorstellbar ist, (z.B. 13^2 -OH Pheid α und der entsprechende Zink-Komplex, vgl. diese Arbeit; 13^2 -OH Chl α' unter bestimmten Versuchsbedingungen, Maunders 1983), ist anzunehmen, daß hydroxylierende Enzyme am Chlorophyllabbau beteiligt sind.

6. Untersuchungen an dunkelgestellten intakten Pflanzen

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß sich in Tabakzellkulturen im Dunkeln Folgeprodukte des Chlorophylls bilden, wurde versucht, diesen Befund an intakten Pflanzen nachzuvollziehen. Primula und Campanulapflanzen aus dem Freiland wurden in Töpfe versetzt und bei 0 und 27°C längere Zeit im Dunkeln gehalten. Im Abstand von 14, 20 und 22 Tagen wurden Proben entnommen und durch DC und HPLC untersucht (Bedingungen siehe II.9.).

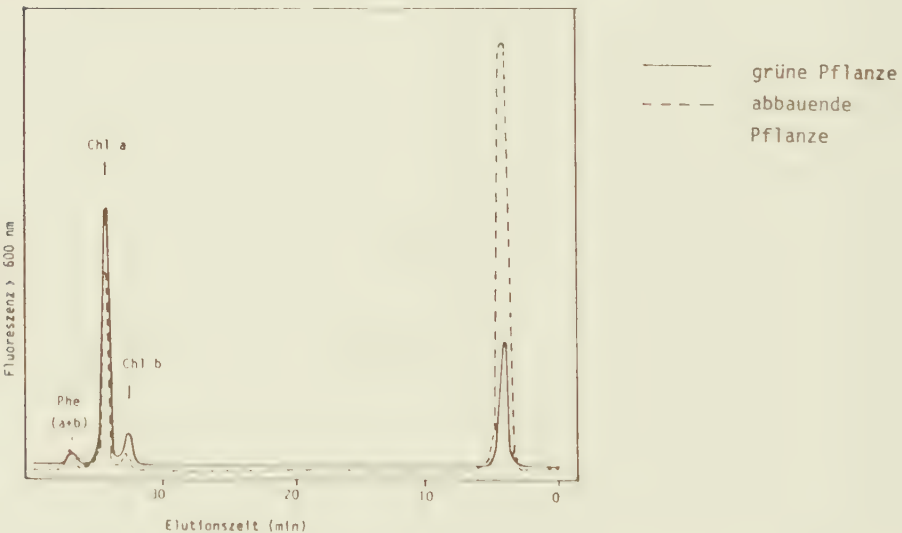


Abb. 41: HPLC-Chromatogramm von Primula-Extrakten aus grünen und 20 Tage dunkel gestellten intakten Pflanzen.
(System 3)

Die Primula- und Campanulaproben zeigen alle dieselbe Pigmentverteilung, zusätzliche Pigmente erschienen im Verlauf von 20 Tagen nicht. Die Gesamtpigmentmenge ist am Schluß der Versuchsdauer sehr gering (bei 27°C ca. 10% des Anfangsgehaltes), die 0°C-Proben sind nahezu unverändert.

Bei den Primulaproben zeigt sich das gleiche chromatographische Bild (auf den DC-Platten scheint es aus, als ob bereits nach kurzer Zeit relativ viel Phe entstanden wäre, dies kann aber durch HPLC nicht bestätigt werden; die Beobachtung, daß beim Auftragen auf die DC-Platte die Pigmente verändert werden, wurde des öfteren gemacht, so daß für quantitative Aussagen über Pigmente immer eine Absicherung über HPLC anzustreben ist). Ein Teil der Primulaextrakte wurde deshalb auch über HPLC untersucht.

Bei den Primeln erscheint bei $R_t = 4.2 \text{ min}$ ein Peak mit einer Fluoreszenzemission 600 nm, der aber keine Absorption bei 663 nm zeigt. Dieser Fluoreszenzpeak, der mit Sicherheit keinem Chl-Derivat entspricht, wurde zu Vergleichszwecken gleich 1 gesetzt.

Die Daten sind in der folgenden Abb. veranschaulicht.

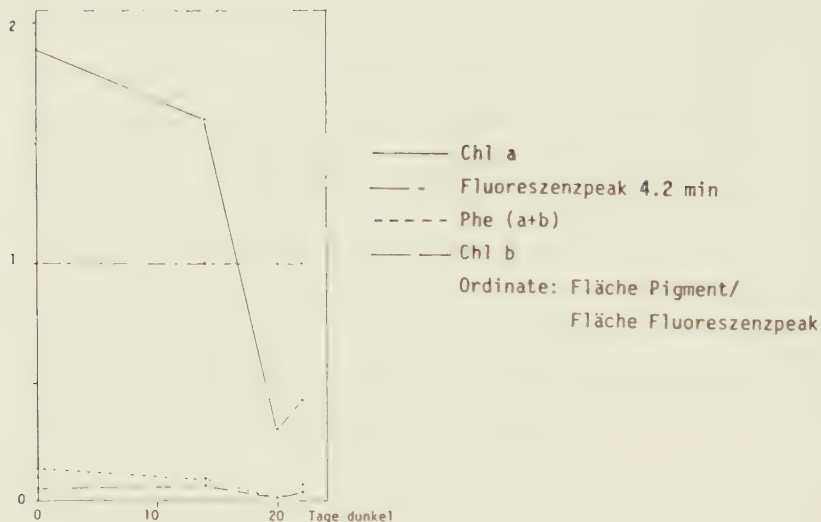


Abb. 42: Auswertung der HPLC-Chromatogramme, Chlorophyll
Abnahme bei dunkel gestellten intakten Pflanzen

Die Fläche des Peaks bei $R_t = 4.2$ min wurde als
Maßstab gleich 1 gesetzt.

Phe a und Phe b werden unter diesen Bedingungen nicht getrennt. Chl a wird im Verhältnis zu Chl b viel schneller abgebaut und zwar offensichtlich zu farblosen Reaktionsprodukten. Dies entspricht den bisher berichteten Daten (Kufner 1977). Auch chemisch ist Chl b gegenüber Licht und Säure unempfindlicher (Svec 1978). In den meisten Berichten über den Chl-Abbau ist aber von Chl b nicht die Rede. In jüngster Zeit erschien eine Arbeit von Maunders (1983), die von Abbauxperimenten an Gerste berichtet. Die dortigen Versuche zeigen, daß Zwischenprodukte nur bei abgeschnittenen Halmen auftreten, nicht jedoch an intakten Pflanzen. Die Akkumulation von Zwischenproduk-

ten des Chlorophyllabbaus ist also in intakten Pflanzen anders als in abgeschnittenen Halmen.

7. Versuche zur Auftrennung von Chlorophyll-Proteinen

Während es über Chlorophyll-Proteine bei grünen bzw. ergrünenden Pflanzen eine ganze Reihe von Untersuchungen gibt (Anderson 1978, 1983, Markwell 1979, Chua, 1979; Bricker 1981; Dequist 1978; Lichtenthaler 1981; Angyroudi-Akoyunoglou 1982) ist sehr wenig über Veränderungen bekannt, die am Chlorophyll-Protein Komplex während der Seneszenz ablaufen. Bereits Egle diskutierte die Möglichkeit, daß der erste Schritt des Abbaus in der Ablösung des Chromophors vom Protein besteht und der weitere Verlauf des Abbaus von Chlorophyll unabhängig vom Protein ist.

Eine andere Möglichkeit wäre, daß der Abbau (z.B. Entmetallierung) am intakten Chlorophyll-Protein-Komplex einsetzt, so daß das entmetallierte (oxidierte, verseifte?) Produkt noch proteingebunden ist.

Chlorophyll-Proteine werden üblicherweise nach Isolierung und Aufbrechen der Chloroplasten und Solubilisierung der Proteine mittels Detergentien durch elektrophoretische Verfahren getrennt. In der Reihenfolge ihrer Wanderung werden sie bezeichnet als: CP1a, CP1, LHCP1, LHCP2, CPa, LHCP3, FC.

(Anderson 1978)

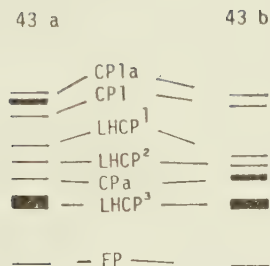


Abb. 43a: Auftrennung von Chl-Proteinen nach
Anderson 1978

Abb. 43b: Eigene Versuche (System 4, vgl. II.11)

Verschiedene Autoren erzielen je nach verwendeter Methode eine unterschiedliche Anzahl an Banden. Zwei dieser Banden gehören zum Photosystem I (CP1a, CP1) die anderen vier gehören zum Photosystem II.

CPa ist das vermutete Reaktionszentrum von PS II, die LHCP-Banden gehören zum "light harvesting" Komplex des PS II.

In dieser Arbeit werden verschiedene Systeme zur Gewinnung von abbauenden Chloroplasten aus Tabakzellkulturen getestet. Zum Vergleich wurden Chloroplasten aus Spinat isoliert. Weiter wurden eine Reihe von bereits beschriebenen Elektrophoretischen Systemen untersucht und in zum Teil modifizierter Form auf ihre Eignung zur Trennung von Chlorophyll Proteinen im

Hinblick auf seneszierende Tabakzellkulturen miteinander
verglichen.

7.1. Präparation von Thylakoiden

7.1.1. aus Spinat

Spinatchloroplasten wurden nach einer modifizierten Methode nach Mourioux und Douce (1981) gewonnen.

Nach Gradientenzentrifugation wurden die Chloroplasten osmotisch geschockt

und mit verschiedenen Detergentien in unterschiedlichen Detergenz:Chlorophyll Verhältnissen solubilisiert. Zur Anwendung kamen SDS, LDS, OGP und Konzentrationen von 2:1, 20:1, 40:1. In der Literatur werden allgemein zwischen 10:1 (Anderson) und 40:1 (Lichtenthaler) Verhältnisse verwendet.

Mit allen Methoden ließ sich eine befriedigende Auftrennung der Chlorophyll-Proteine erreichen; als günstig erwies sich ein Detergenz:Chlorophyll Verhältnis von 20:1 (vgl. Abb. 43b).

7.1.2. aus grünen Tabakzellkulturen

Die Chloroplasten aus Tabakzellkulturen sind sehr klein im Vergleich mit solchen aus Spinat (1-2 μm , Spinat: um 8 μm). Sie sind im Lichtmikroskop nur als Punkte zu erkennen. Die Methode zur Gewinnung von Spinatchloroplasten konnte deshalb nicht verwendet werden. Ihre Isolierung gelang jedoch mit der Methode von Sato (1977) über eine Sephadex G 50 (coarse) Säule als entscheidendem Anreicherungs-schritt.

7.1.3. aus abbauenden Tabakzellkulturen

Die Isolierung mit der Methode von Sato gelang nicht. Bei entsprechenden Versuchen fiel auf, daß die Zellwand abbauender Tabakzellen sehr zäh ist.

Es wurden deshalb andere Methoden zur Isolierung von Chloroplasten ausprobiert wie Homogenisierung mit der French Press, Andauen der Zellwände mit Cellulysin (Murashige et al. 1974) und Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff. Der Erfolg der jeweiligen Methode wurde durch Mikroskopie überprüft.

Schockgefrieren und die Behandlung mit Cellulysin hatten am wenigsten Erfolg. Im Falle von Cellulysin könnte dies daran liegen, daß dieses Enzym Pflanzenspezifisch ist, z.B. können mit Cellulysin Haferzellwände angedaut werden, nicht jedoch Spinatzellwände (Hopf, pers. Mitt.).

Die Behandlung mit der French Press erzeugt nur noch Membranbruchstücke.

Durch Pötern und Zerkleinerung mit der Reibschale konnte schließlich ein Aufbrechen der Zellwand erreicht werden. Durch Säulenchromatographie (Sephadex G 50 coarse) konnten die Bruchstücke in zwei Fraktionen aufgetrennt werden:

Fraktion A (ca. 5% des Homogenats) verhält sich wie eine Chloroplastenfraktion aus grünen Tabakzellkulturen.

Fraktion B (ca. 95% des Homogenats) bleibt auf der Säule hängen und kann nicht eluiert werden. Durch diese Aufarbeitung gelingt also nur eine Anreicherung der wenigen noch intakten Chloroplasten, die auch in abbauenden Zellkulturen noch enthalten sind. Eine

pheophytinhaltige Chloroplastenfraktion kann auf diese Weise nicht erhalten werden. Die Extraktion der Pigmente und Messung der Absorptionsspektren während der Aufarbeitung bestätigt die Anreicherung von Chlorophyll auf Kosten des Pheophytinanteils (Abb. 44).

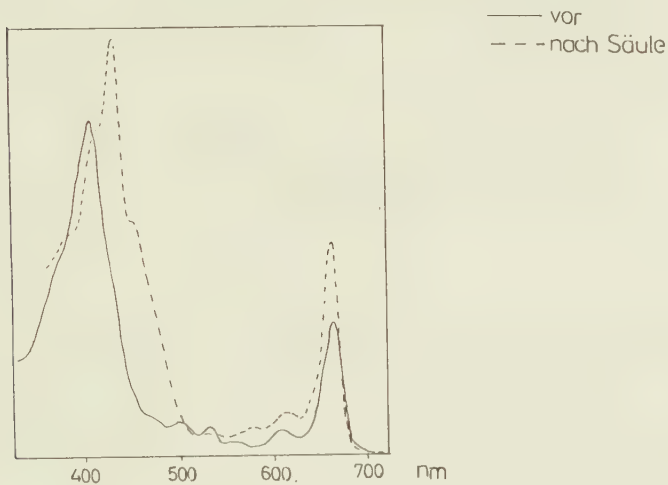


Abb. 44: Etherspektren von Extrakten aus abbauenden Tabakzellkulturen während der Aufarbeitung.

Mit einer Reinigung über Gradientenzentrifugation konnten zwar zwei grüne Banden (vgl. Abb. 45) erhalten werden (entsprechend 1 - 5% Gesamtpigment), mehr als 90% des Gesamtpigments traten in einer breiten einheitlichen Bande auf. Die zwei grünen Banden wurden wie üblich auf Chlorophyll-Proteine hin aufgearbeitet. Nach Solubilisierung und Elektrophorese ergaben sich keine Unterschiede zu üblichen Chlorophyll-Banden.

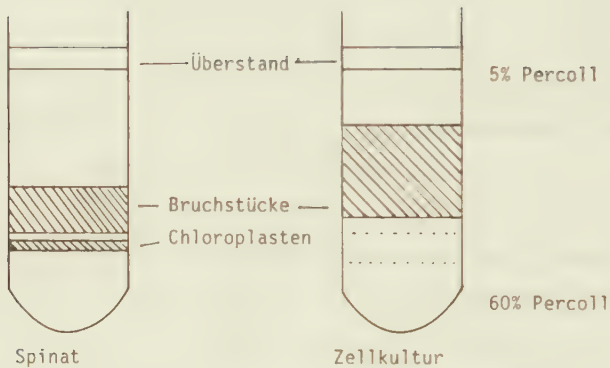


Abb. 45: Vergleich der Gradientenzentrifugation zwischen Spinat und abbauenden Tabakzellkulturen

Nachdem durch die bisher verwendeten, recht zeitaufwendigen Verfahren ohnehin keine Anreicherung pheophytin-haltiger Chloroplasten zu erreichen war, wurde folgendes einfache Verfahren zur Präparation von Thylakoiden aus abbauenden Tabakzellkulturen angewandt:

Die Zellkulturen werden gewaschen, im Mörser zerkleinert und durch 4 Lagen Mull gepreßt. Das Filtrat wird zur Entfernung von ganzen Zellen und größeren Bruchstücken 1 min bei 300 g abzentrifugiert, der Überstand wird 20 min bei 14000 g abzentrifugiert. Der Niederschlag wird direkt zur Solubilisierung eingesetzt. Dadurch sollte erreicht werden, daß wenigstens ein geringer Anteil Pheophytin auf das Gel aufgetragen werden kann. Auch bei dieser Auftrennung konnten jedoch nur die üblichen grünen Chlorophyll-Protein Banden beobachtet werden. Das Pellet der Solubilisierung zeigte nach Extraktion mit

Aceton ein Pheophytinspektrum. Auch bei dieser direkten Solubilisierung werden offensichtlich intakte Chlorophyll-Protein Komplexe stark angereichert. Auch die FP ("free pigment") Bande zeigte ein Chlorophyllspektrum. Dieses Verfahren hat zudem den Nachteil, daß noch sehr viel Fremdprotein vorhanden ist. Die Ausbeute der Solubilisierung ist sehr schlecht, von 380 µl eingesetztem Solubilisierungsmedium konnten nur noch 60 µl zur Elektrophorese eingesetzt werden.

7.2. Elektrophoresen

Zur Trennung der Chlorophyllproteine wurden eine Reihe verschiedener Elektrophoresen eingesetzt. Die Modifizierungen beziehen sich auf die Konzentrationen des Obergels und die Zusammensetzung des Trenngels. Getestet wurden die Systeme von Bricker und Newman (1980), Markwell et al. (1979), Lichtenthaler et al. (1981) und Benz (unveröffentlicht, modifiziert nach Maurer (1968).

Die beste Aufspaltung in Proteinbanden konnte mit Lichtenthalers System erreicht werden bei einer Solubilisierung mit LDS:OGP (2:1) : Chl 20:1 (Abb. 43). Bei der Methode von Markwell et al. war die geringste Abspaltung an freiem Pigment zu beobachten. Zur Übersicht über die verwendeten Methoden vgl. Tabelle 1 (S. 37).

Bei keiner dieser Methoden konnten Unterschiede im Chlorophyll - Proteinmuster zwischen grünen und

abbauenden Zellkulturen festgestellt werden.

7.3. Diskussion

Die erste Schwierigkeit bei der Untersuchung des Schicksals der Chlorophyll Proteine liegt in der Isolierung von abbauenden Chloroplasten. Zumindest bei Tabakzellkulturen versagen die gängigen Methoden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß im Verlauf der Seneszenz die Größe der Plastiden abnimmt (Barton 1966), verbunden mit einer Auflösung der Membranstruktur (Butler et al. 1970). Zu diesen Befunden paßt, daß pheophytinhaltige Chloroplasten nicht mehr über eine Ausschlußchromatographie mit Sephadex G 50 angereichert werden können. Offensichtlich ist hier die morphologische Veränderung schon soweit fortgeschritten, daß von Chloroplasten im eigentlichen Sinne nicht mehr gesprochen werden kann.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Untersuchung von Chlorophyll- Proteinen ist, daß das Pigment nicht kovalent ans Protein gebunden ist. Alle elektrophoretischen Untersuchungen ergeben deshalb wechselnde Anteile an freiem Pigment. Tatsächlich gelang es erst 1979 Markwell et al. nachzuweisen, daß alles Chlorophyll proteingebunden ist.

Da die Möglichkeit besteht, daß der erste Schritt des Chlorophyll - Abbaus in der Loslösung vom Protein besteht (Egle 1966), läßt sich abschätzen, daß hier noch ein weites Feld für zukünftige Untersuchungen liegt.

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. In Rohextrakten aus abbauenden Tabakzellkulturen werden $^{132}\text{(R)}$ - und $^{132}\text{(S)}$ - Hydroxypheophorbide a durch Chromatographie, Kernresonanz- und Massenspektroskopie sowie Circular dichroismus nachgewiesen.

2. Bei Tabakzellkulturen, welche 72 Stunden bei 41°C im Dunkeln belassen wurden finden sich zusätzlich die Zinkkomplexe der beiden 132 -Hydroxypheophorbide a

3. In intakten Pflanzen (geprüft an *Primula* und *Campanula*) häufen sich diese Produkte nicht an.

4. Ein Zusammenhang zwischen der Lipoxxygenaseaktivität und dem Ausbleichen von Chlorophyll besteht bei Tabakzellkulturen nicht. Dagegen konnte gezeigt werden, daß bereits ein Nullwert aus Chl a, Linolsäure und Puffer eine Bleichungs- Reaktion zeigt. Dabei entstehen zwei Produkte, welche chromatographisch mit den Reaktionsprodukten der Oxidasereaktion identisch sind.

5. Bei einem Nullwert zur Oxidasereaktion (Lüthy et al. 1984) entstehen zwei Produkte. Das erste dieser Produkte ist 132 -Hydroxychlorophyll a (Schoch, in Vorbereitung); als Struktur des zweiten Produktes wird $^{132},20$ Dihydroxychlorophyll a vorgeschlagen und diskutiert.

6. Bei der Inkubation von Zellhomogenaten aus grünen

und abbauenden Tabakzellkulturen treten innerhalb von 3 Std. keine Veränderungen der Gesamtpigmentmenge oder der Pigmentzusammensetzung auf.

7. Literaturberichte über eine Mg- freisetzende Aktivität (Owens et al. 1982) können bei Tabakzellkulturen nicht bestätigt werden. Unter den angegebenen Bedingungen ist keine Aktivität nachweisbar, der Zusatz von 1% Triton X 100 zeigt keinen Effekt.

8. Verschiedene Elektrophoresesysteme wurden auf ihre Eignung zur Auftrennung von Chlorophyll - Proteinen getestet. Die höchste Auflösung bringt das System von Lichtenthaler et al. modifiziert in der Solubilisierung der Proteine durch LDS:OGP (2:1) : Chl 20:1. Bei der Methode nach Markwell et al. tritt die geringste Abspaltung an freiem Pigment auf.

9. Abbauende Chloroplasten aus seneszierenden Tabakzellkulturen durchlaufen so tiefgehende morphologische Veränderungen, daß sie mit den üblichen Methoden nicht mehr isoliert werden können.

V. Literaturverzeichnis

- ANDERSON, J.M.: Chlorophyll-Protein Complexes of Spinach and Barley Thylakoids. FEBS Lett. 92, 227 (1978)
- ANDERSON, J.M.: P 700 Content and Polypeptide Profile of Chlorophyll-Protein Complexes of Spinach and Barley Thylakoids. BBA 591, 113-126 (1979)
- ARGYROUDI-AKOYUNOGLU, J.H., A. AKOYUNOGLU, K. KALOSAKAS, G. AKOYUNOGLU: Reorganisation of the Photosystem II Unit in Developing Thylakoids of Higher Plants after Transfer to Darkness. Plant Physiol. 70, 1242-1248 (1982)
- ARNON, D.I.: Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. Plant Physiol. 24, 1 (1949)
- BARRET, J. and S.W. JEFFREY: Chlorophyllase and Formation of an Atypical Chlorophyllid in Marine Algae. Plant Physiol. 39, 44 (1962)
- BARTON, R.: Fine Structure of Mesophyll Cells in Senescing Leaves of Phaseolus. Planta 71, 314-325 (1966)
- BEN-DAVID, H., N. NELSON and S. GEPSTEIN: Differential Changes in the Amount of Protein Complexes in the Chloroplast Membrane during Senescence of Oat and Bean Leaves. Plant Physiol. 73, 507-510 (1983)
- BETHGE, H.: Spektralphotometrische Untersuchungen rauchgeschädigter Pflanzen. Schriftenr. Ver. Wasser Boden-, Lufthyg. 1 F. Nr. 12, 1-22 (1957)
- BIERE, H.: Ein Weg zum Protochlorophyll und Untersuchungen an 10 - substituierten, diastereo-

- Correlation with Molecular Orbital Calculations.
JACS 87,104 (1965)
- EGLE,K.: Biologischer Chlorophyllabbau in W.RUHLAND (ed)
Handbuch der Pflanzenphysiologie Bd.V/1 354-386
(1960)
- ENDO,H., H.HOSOYA, T. KOYAMA and M.ICHIOKA: Isolation of
10-Hydroxypheophorbide a as a Photosensitizing
Pigment from Alcohol-treated Chlorella Cells.
Agric.Biol.Chem.46(9),2193-2193 (1982)
- FISCHER,H. und H.ORTH: Die Chemie des Pyrrols Vol.II 2nd
Half, Leipzig 1940
- FISCHER,H. und J.HECKMAIER: Überführung von
Phäoporphyrin a 5 in Phäoporphyrin a 6 und
Neophäoporphyrin a 6. Liebigs Ann. 508,250-262
(1934a)
- FISCHER,H. J.HECKMAIER und T.SCHERER: über Oxidations-
produkte von Phäophorbid a und Phäoporphyrin a 5
Liebigs Ann. 510,169 (1934b)
- GEPSTEIN,G. and K.V.THIMANN: The Role of Ethylene in the
Senescence of Oat Leaves. Plant Physiol. 68,349
(1981).
- GOODHEER,J.C.: Visible Absorption and Fluorescence of
Chlorophyll and its Aggregates in solution.
In: VERNON,C..P., and G.R.SEELY (eds.) The
Chlorophylls, Academic Press 1966
- GOODWIN,T.W.: Studies in Carotenogenesis. 24. The
Changes in Carotenoid and Chlorophyll Pigments in
the Leaves of deciduous trees during autumn
necrosis. Biochem.J. 68, 503-511 (1958)
- GREENBLATT,C.L. and J.A.SCHIFF: A Pheophytin-like

- meren Phorbinen. Dissertation Braunschweig 1966
- BISWAL, K.C., H.KASEMIR, and H.MOHR: Phytochrome Control of Degreening of Attached Cotyledons and Primary Leaves of Mustard (*Sinapis alba* L.) Seedlings
Photochem. Photobiol. 35, 237-241 (1982)
- BLANK, M.: Chlorophyllabbau in seneszierenden Tabakzellkulturen. Einfluß der Temperatur. Diplomarbeit München 1983
- BRICKER, T. and D.NEWMAN: Quantitative Changes in the Chloroplast Thylakoid Polypeptide Complement during Senescence. Z.Pflanzenphysiologie 98, 339 (1980)
- BRICKER, T. and D.NEWMAN: The Chlorophyll Proteins of Soybean. Z.Pflanzenphysiol. 104, 91 (1981)
- BROWN, S.B., and R.F.TROXLER in HEIRWEGH, K.P. and S.B. BROWN (eds.) Bilirubin Metabolism Vol. II, 1-39
CRC PRESS Boca Raton 1983
- BUTLER, R.D. and E.W.SIMON: Ultrastructural aspects of senescence in plants. Adv.Gerontol.Res. 3, 73-129 (1976)
- CHUA, N. and P.DELEPELAIRE: LDS-PAGE of Thylakoid Membranes at 40°C. Charakterisations of two additional Chlorophyll a Protein Complexes.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 111 (1979)
- CLOSS, G.L., J.J.KATZ, F.C.PENNINGTON, M.R.THOMAS and H.H. STRAIN: NMR-Spectra and Molecular Association of Chlorophylls a and b, Methylchlorophyllides, Pheophytins and Methylpheophorbides. JACS 85, 3809 - 3821 (1963)
- DOUGHERTY, R.C., H.H.STRAIN and J.J.KATZ: Hydrogen Exchange in Chlorophyll and Related Compounds, and

- Pigment in Dark-Adapted *Euglena gracilis*.
J. Protozool. 6, 23-28 (1959)
- GRIFFITHS, W.T.: Reconstitution of Chlorophyll
Synthesis. Biochem. J. 174, 681-692 (1978)
- GROSSMANN, S. and A. BEN-AZIZ: Enzymatic Oxidation of
Carotene and Linoleate by alfalfa. Phytochemistry
8, 2287-2293 (1969)
- HOLDEN, M.: Chlorophyll Bleaching by Legume Seeds.
J. Sci. Food Agr. 16(6) 312-325 (1965)
- HOLT, A.S.: The Phase Test Intermediate and the
Allomerisation of Chl a. Can. J. Biochem. Physiol.
36, 439 (1958)
- HUFF, A.: Peroxidase-catalysed Oxidation of Chlorophyll
by Hydrogen Peroxide. Phytochemistry 21, 261 (1982)
- HYNNINEN, P.H. and G. SIEVERS: Conformations of
Chlorophyll a and a' and their Magnesium-free
Derivatives as Revealed by Circular Dichroism and
Proton Magnetic Resonance. Z. Naturforschung 36b,
1000-1009 (1981 a)
- HYNNINEN, P.H.: Mechanism of the Allomerisation of
Chlorophyll. Inhibition of the Allomerisation by
Carotenoid Pigments. Z. Naturforschung 36b, 1010-
1016 (1981 b)
- HYNNINEN, P.H. and S. LTJENEN: Electrophilic Substitution
at the δ -methine bridge of Pheophorbide a and a'
Tetrahedron 22, 1845-1846 (1981 c)
- IMAMURA, S. and S. SHIMIZU: Metabolism of Chlorophyll in
higher plants IV. Relationship between fatty acid
oxidation and chlorophyll bleaching in plant

- extraxts. *Plant Cell Physiol.* 15,187-190 (1974)
- INHOFFEN,H.H. und A.GOSSAUER: Zur weiteren Kenntnis des Chlorophylls und des Hämins. XXIII. meso-Acetoxylierung des Gemini-monoketons von Octaäthylporphin. *Liebigs Ann.* 723, 135-148 (1969)
- IRIJAMA,K. and M.SHIRAKI: An improved method for extraction, partial purification, separation and isolation of chlorophyll from spinach leaves. *J.Liqu.Chrom.* 2, 255-276 (1979)
- JENSEN,R.G. and J.A.BASSHAM: Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 56, 1095-1101 (1966)
- JOHNSTON,L.G. and W.F.WATSON: *J.Chem.Soc.* 1203 (1956)
- JONES,I.D., R.C.WHITE, E.GIBBS and L.S.BUTLER: Estimation of Zinc Pheophytins, Chlorophylls and Pheophytins in Mixtures in Diethylether or 80% Aceton by Spectroscopy and Fluorometry. *Agr.Food Chem.* 25, 146 (1977)
- KLEUDGEN,H.K.: Changes in Composition of Chlorophylls, Carotenoids and Prenylquinones in Seedlings of *Hordeum* and *Raphanus* Induced by the Herbicide SAN 6706 - an Effect Possibly Antagonistic to Phytochrome Action. *Pesticide Biochem.Physiol.* 12, 231- 238 (1979)
- KUFNER,R.B.: The Biological Degradation of Chlorophyll in Senescent Tissues. In F.C.Cygan (ed): *Pigments in Plants*, 308-312. Gustav Fischer,Stuttgart, New York 1980
- LAEMMLI,U.K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.

Nature 227, 680 (1970)

LARSEN, P., K. PEACH and M. V. TRASEY: Growth Substances in higher Plants. In: Modern methods of Plant analysis Springer Verlag, Vol. 3, 565 (1955)

LEONG, T. and J. M. ANDERSON: Adaption of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. II. Regulation of electron transport capacities, electron carriers, coupling Factor (CF₁) activity and rates of photosynthesis. Photosynthesis Research 5, 117 - 128 (1984)

LICHTENTHALER, H. K., G. BURKHARD, G. KUHN and U. PRENZEL: Light induced Accumulation and Stability of Chlorophylls and Chlorophyll-Proteins during Chloroplast Development in Radish Seedlings. Z. Naturforschg. 36c, 421-430 (1981)

LOGEMANN, H. und L. BERGMANN: Einfluß von Licht und Medium auf die "Plating Efficiency" isolierter Zellen aus Calluskulturen von *Nicotiana tabacum* var. "Samsun". Planta 121, 283 (1974)

LÜTHY, B., E. MARINOIA, Ph. MATILE and H. THOMAS: Thylakoid associated "Chlorophyll-Oxidase": Distinction from Lipooxygenase. Z. Pflanzenphys. 113, 423-434 (1984)

MARKWELL, J. P., P. THORNER and R. T. BOGGS: Higher Plant Chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1233 (1979)

MARTIN, C. and K. V. THIMANN: The Role of Synthesis in the Senescence of Leaves. I. The formation of protease. Plant Physiol. 49, 64 - 71 (1972)

MARTINOIA, E., M. J. DALLING and P. MATILE: Catabolism of

- Chlorophyll: Demonstration of chloroplast-localized peroxidative and oxidative activities. Z.Pflanzenphys. 107, 268 (1982)
- MATILE,P.: Catabolism of Chlorophyll: Involvement of Peroxidase. Z.Pflanzenphys. 99, 475-478 (1980)
- MAUNDERS,M.J., S.B.BROWN and H.W.WOOLHOUSE: The Appearance of Chlorophyll Derivatives in Senescing Tissue. Phytochemistry 22, 2443 (1983)
- MAURER,R.H.: Disk-Elektrophorese. de Gruyter, Berlin 1968
- MEYER,A.: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. A.Felix, Leipzig 1883
- MOLISCH,H.: Eine neue mikrochemische Reaktion auf Chlorophyll. Ber.dt.bot.Ges. 14,16 (1896)
- MOURIQX,G. and R.DOUCÉ: Slow Passive Diffusion of ortho-Phosphate between intact isolated chloroplasts and suspending medium. Plant Physiol. 67, 471 (1981)
- MURASHIGE,T. and U.HIROFUMI: Evaluation of Parameters in the Isolation of viable Protoplasts from cultured tobacco cells. Plant Physiol. 54, 936-944 (1974)
- MURASHIGE,T. and F.SKOGG: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol.Plant. 15, 473 - 497 (1962)
- QUIST,G. O.MARTENSSON, B.MARTIN and G.MALMBERG: Seasonal Effects on Chlorophyll-Protein Complexes isolated from Pinus silvestris. Physiol.Plant. 44, 187 - 192 (1978)
- ORGANIKUM, VEB Dt.Verlag der Wissenschaften, Berlin 1976

- OWENS, T.G. and P.G.FALKOWSKI: Enzymatic Degradation of Chlorophyll a by Marine Phytoplankton in vitro. *Phytochemistry* 21, 979 (1982)
- PARK, R.B.: Chloroplast Structure. In: L.P.VERNON, G.R. SEELY (eds.): *The Chlorophylls*. Academic Press 1966
- PARK, Y., M.M.MORRIS and G.MACKINNEY: On Chlorophyll Breakdown in Senescent Leaves. *J.Agr.Food Chem.* 21, 279 - 281 (1973)
- PENNINGTON, G.C., H.H.STRAIN, W.A.SVEC and J.J.KATZ: Preparation and Properties of 10-Hydroxy Chlorophylls a and b. *JACS* 89, 3875 - 3880 (1967)
- PERKINS, H.J. and D.W.A.ROBERTS: Methods for the Purification of C - labelled chlorophylls a and b. *BBA* 58, 486 (1962)
- SABATER, B. and M.T.RIDRIGUEZ: Control of Chlorophyll Degradation in Detached Leaves of Barley and Oat through Effect of Kinetin on Chlorophyllase levels. *Physiol.Plant.* 43, 274 - 276 (1978)
- SAKAI-IMAMURA, M.: Fatty acid oxidation and chlorophyll bleaching. *Nat.Sci.Rep.Ochanomizu Univ.* 26 (2), 109 - 125 (1975)
- SATO, S. and I.WASHITANI: Studies on the function of proplastids in the metabolism of in vitro cultured tobacco cells. I. Localisation of nitrite reductase and NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 18, 117 - 125 (1977)
- SCHEER, H., H.WIESCHHOFF, W.SCHAFER, E.CMIEL, B.NITSCH, H.-M.SCHIEBEL and H.-R.SCHULTEN: Structure of a Chlorophyll RC 1. *Adv.Photosynth.Res.* II.2.81, 1984
- SCHOCH, S., H.SCHEER, J.A.SCHIFF, W.RÜDIGER and H.W.SIE-

- GELMANN: Pyropheophytin a Accompanies Pheophytin a in Darkened Light Grown Cells of Euglena. Z.Naturforschg. 36 c, 827 (1981)
- SCHOCH, S. and F.VIELWERTH: Chlorophyll Degradation in Senescent Tobacco Cell Culture (*Nicotiana tabacum* var. Samsun). Z.Pflanzenphys. 110, 309 - 317 (1983)
- SCHOCH, S., M.BLANK and B.SCHMIDT: The Influence of Temperature on Chlorophyll Degradation in Tobacco Cell Culture. Adv.Photosynth.Res.IV.3.259 (1984)
- SCHOCH, S., W.RÜDIGER, B.LÜTHY and Ph.MATILE: 13²-Hydroxytroxychlorophyll a, the First Product of the Reaction of Chlorophyll-Oxidase. J.Plant.Physiol. 115, 85 - 89 (1984)
- SEYBOLD, A. und K.EGLE, Hoppe - Seylers Z.physiol.Chem. 257, 49 (1939)
- SMITH, K.M.: Mass Spectrometry of Porphyrins and Metalloporphyrins in K.M.SMITH (ed.): Porphyrins and Metalloporphyrins. Elsevier Scientific Co. Amsterdam, New York 1975
- SOMAYA, O.: Darstellung des meso-Methyl-Octaäthylprophyrins und Untersuchungen an Porphyrin und Chlorin-Metallkomplexen. Dissertation Braunschweig 1967
- STAHL, E.: Zur Biologie des Chlorophylls. Laubfarbe und Himmelslicht, Vergilbung und Etiolement. G.Fischer Jena 1909
- STODDART, J.L. and H.THOMAS: Leaf Senescence. In: D.BOULTER and B.PARTIER (eds.): Encyclopedia in Plant Physiol. New Series Vol. 14 A, 592 -636 Springer Verlag 1982

- STRELL,M.: Veränderungen von Phorbinen und Chlorinen durch Komplexbildende Metalle. Liebigs Ann. 612, 264 - 271 (1958)
- SVEC,W.A.: The Isolation, Preparation, Characterisation and Estimation of the Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. In: D.DOLPHIN (ed.): The Porphyrins Vol. V. Part C p.341 (1978), Academic Press New York 1978
- TANTAWY,M.M. and L.H.GRIMME: The bleaching Induced by the Phenylpyridazinon Herbicide Metfluronazon in Chlorella is a Metabolic and Reversible Process. Pesticide Biochem.Physiol. 18, 965 (1982)
- TERPSTRA,W.: Identification of Chlorophyllase as a Glycoprotein. FEBS Lett. 126, 231 - 235 (1981)
- TETLEY,R.M. and K.V.THIMANN: Metabolism of Oat Leaves During Senescence.I.Respiration, Carbohydrate Metabolism, and the action of Cytokinins. Plant Physiol. 54, 294 - 303 (1974)
- THIMANN,K.V., R.M.TETLEY, and B.M.KRIVAK: Metabolism of Oat Leaves during Senescence.V.Senescence in Light. Plant Physiol. 59, 448 - 454 (1977)
- THIMANN,K.V.: The Senescence of Leaves. In:K.V.THIMANN: Senescence in Plants. p.85 - 115, CRC Press Florida, 1980
- THOMAS,H. and J.L.STODDART: Leaf Senescence. Ann.Rev. Plant Physiol. 31, 83 - 111 (1980)
- TIEGS,E.: über den spektralphotometrischen Phäophytinnachweis in Chlorophyll-Extrakten. Kl. Mitt.Ver.Wasser-,Boden- und Lufthyg. 14, 34 (1938)
- TIEGS,E.: über den spektralphotometrischen Phäophy-

- tinnachweis in Chlorophyllextrakten. Kl.Mitt. Ver. Wasser-, Boden- und Lufthyg. 15,313-320 (1939)
- TUCKER,D.J.: Phytochrome Regulation of Leaf Senescence in Cucumber and Tomato. Plant Sci.Lett. 23, 103 - 108 (1981)
- VIELWERTH,F.X.: Chlorophyllabbau in seneszierenden Tabakzellkulturen. Diplomarbeit, München 1982
- WIDART,M.M., M.DINANT, F.FLECHY and J.AGHIOU:
Interaction between photosynthtic pigments bound to lipid and protein particles. Photochemical properties. Photochem. Photobiophys. 1, 103 (1980)
- WILLSTÄTTER,R. und A.STÖLL: Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913
- WILLSTÄTTER,R. und A.STÖLL: In: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. p.448 Springer Verlag Berlin 1918
- WOLF,H. and H.SCHEER: Stereochemistry and chiroptic properties of Pheophorbides and Related Compounds. Ann.N.Y.Acad.Sci. 206, 549 - 567 (1973)
- ZIEGLER,R. and S.H.SCHANDERL: Chlorophyll Degradation and the Kinetics of Dephytylated Derivatives in a mutant of Chlorella. Photosynthetica 3, 45 - 54 (1969)
- ZIEGLER,R., M.DRESKEN, B.HERL, M.MENTH, H.SCHNEIDER and P.ZANGE: "Mg-Dechelataase", ein Chlorophyll abbauendes Enzym. Meeting: Deutsche Botanische Gesellschaft (Freiburg) 1982 Book of abstracts, 472
- ZIEGLER,R., N.GHUA and B.SCHNELL: über die Aktivität der "Mg-Dechelataase" beim biologischen Chlorophyllabbau. Meeting: Dt.Bot.Ges. (Freiburg)

1982, Book of Abstracts, 473

ZIMMER,B.: Ist der Chlorophyllabbau ein enzymatischer
Prozess? Zulassungsarbeit, München 1984

ZIMMERMANN,D.C. and B.A.VICK: Hydroperoxide Isomerase.
A New Enzyme of Lipid metabolism. Plant Physiol.
46, 445 - 453 (1970)

VI. Anhang

Zellkultur

Verwendet wurde der Stamm *Nicotina tabacum* var. "Samsun".

1. Zusammensetzung des Mediums

Modifiziertes Medium nach Murashige und Skoog (Logemann und Bergmann 1970)

Substanz	MG	g/l	Mol/l
NH_4NO_3	80	1,65	20,6 mM
KNO_3	101,1	1,90	18,8 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	246,48	370 mg	1,5 mM
KH_2PO_4	136,09	170 mg	1,25 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	146,99	435 mg	3,0 mM
KJ	166,01	825 µg	5,0 µM
Myo-Inosit	180,16	100 mg	555 µM
Saccharose	342,3	20 g	58,4 mM
Sequestren*	-	10 mg	-
- NAA	186,21	200 µg	1,07 µM
H_3BO_3	61,83	6,2 mg	100 µM
$\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	223,06	22,3 mg	100µM
$\text{ZnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	233,43	8,6 mg	30 µM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	213,97	250 µg	1,0 µM
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	249,68	25 µg	0,1 µM
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	237,93	25 µg	0,1 µM
Kinetin	225	100 µg	0,44 µM

Der pH wurde auf 5,9 eingestellt und das in 300 ml Erlenmeyerkolben abgefüllte Medium im Autoklaven bei 120°C 20 min sterilisiert.

* Sequestron 138 Fe war ein Geschenk der Fa. Ciba-Geigy. Es ersetzt FeSO_4 und Na_2EDTA . Das Molekulargewicht ist nicht bekannt. Der Eisengehalt beträgt ca. 6%.

Anhang 2 : Programm zur Berechnung der Menge an Solubilisierungsmedium

uLIST

```
5 HOME
10 PRINT "CHLOROPHYLL-BERECHNUNG"
11 PRINT
12 PRINT "-----"
13 PRINT
19 PRINT
20 INPUT "GEBEN SIE EX645 EIN: "
   ;EX645
21 PRINT
22 INPUT "GEBEN SIE E 663 EIN: "
   ;E663
29 PRINT
30 PRINT "CHL = 20.2*EX645 + 8.0
   4*E 663"
31 PRINT
40 PRINT 20.2 * EX645 + 8.04 * E
   663
49 PRINT
50 INPUT "IN WIEVIEL ML 80% ACET
   ON WURDE GEMESSEN ?";A
59 PRINT
60 INPUT "AUS WELCHEM VOLUMEN WU
   RDE DAS ALIQUOT ENTNOMMEN?";M
69 PRINT
70 INPUT "WIEVIEL ML WURDEN ENTN
   OMMEN?";C
78 INVERSE
79 PRINT
80 PRINT (20.2 * EX645 + 8.04 *
   E663) * A * B /\`C /\`1000
81 NORMAL
89 PRINT
90 PRINT "DIES SIND DIE MG CHL I
   M GESAMTVOLU
   MEN!"
99 PRINT
100 PRINT "BEI EINEM LDS:CHL VER
   HAELTNIS VON 20:1 WIRD ALSO
   FOLGENDE LDS-MENGE BENDETIG
   T"
110 F = (20.2 * EX645 + 8.04 * E6
   63) * A * B /\`C /\`1000
118 INVERSE
119 PRINT
120 PRINT 20 * F
121 NORMAL
1000 END
```

Lebenslauf

27.9.1954	Geburt in Behringersdorf/Lauf
1960 - 1965	Volksschule in Nürnberg
1965 - 1967	Hardenberg Gymnasium in Fürth
1967 - 1974	Martin Behaim Gymnasium in Nürnberg
1974	Abitur
1974 - 1975	Zivildienst
1975 - 1976	Studium: Geschichte und Politikwissen- schaft
1976 - 1980	Studium: Lebensmittelchemie
1980	1.Staatsprüfung
1981	Praktikum am Landesuntersuchungsamt Süd- bayern
1981	2.Staatsprüfung
1.1.1982	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Prof. Dr.W.Rüdiger

